



# Instrumentation optique pour la caractérisation des tissus : analyse de la complémentarité et des limites techniques de fluorescence hyperspectrale et de Tomographie Optique Cohérente en vue de leur intégration multimodale.

Jeremy Météau

## ► To cite this version:

Jeremy Météau. Instrumentation optique pour la caractérisation des tissus : analyse de la complémentarité et des limites techniques de fluorescence hyperspectrale et de Tomographie Optique Cohérente en vue de leur intégration multimodale.. Optique [physics.optics]. Université de Franche-Comté, 2014. Français. NNT : 2014BESA2041 . tel-01228152

**HAL Id: tel-01228152**

**<https://theses.hal.science/tel-01228152>**

Submitted on 12 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# SPIM

## Thèse de Doctorat



école doctorale **sciences pour l'ingénieur et microtechniques**  
UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

### **Instrumentation optique pour la caractérisation des tissus biologiques :**

Analyse de la complémentarité et des limites  
des techniques de fluorescence hyperspectrale  
et de Tomographie Optique Cohérente en vue  
de leur intégration multimodale

Soutenue publiquement le 08 juin 2014

■ JÉRÉMY MÉTEAU



# SPIM

## Thèse de Doctorat



école doctorale **sciences pour l'ingénieur et microtechniques**  
UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

### Composition du jury

<i>Président :</i>	Hervé MAILLOTTE	Institut FEMTO-ST, Besançon
<i>Rapporteurs :</i>	Isabelle VERRIER	Laboratoire Hubert Curien, Saint-Etienne
	Dominique BARCHIESI	UTT, Troyes
<i>Examineurs :</i>	James DAT	Université d'Angers, Angers
	Serge MONNERET	Institut Fresnel, Marseille
	Luc FROEHLY	Institut FEMTO-ST, Besançon
	Christian PIERALLI	Institut FEMTO-ST, Besançon
	Bruno WACOGNE	Institut FEMTO-ST, Besançon



# Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué dans l'équipe biophotonique du département d'Optique de l'Institut FEMTO-ST. Je remercie Hervé Maillotte, chef de département, pour son accueil. Je remercie également la région Franche-Comté pour avoir assuré le financement de cette thèse pendant trois ans.

Je remercie beaucoup Isabelle Verrier et Dominique Barchiesi d'avoir accepté d'être rapporteurs. Je remercie également James Dat et Serge Monneret d'avoir accepté de faire parti du jury.

Je remercie mon directeur de thèse Bruno Wacogne pour sa disponibilité et ses conseils ainsi que le directeur de l'école doctorale SPIM, Philippe Lutz.

Je tiens à remercier Christian Pieralli pour son soutien et ses conseils en spectroscopie. Je tiens à remercier Luc Froehly pour son soutien en OCT mais surtout pour m'avoir permis d'effectuer des conférences internationales, de rédiger un article et donner la possibilité de travailler dans un des principaux laboratoires à Vienne (Autriche) dans ce domaine.

Je tiens également à remercier Olivier Gaiffe pour son soutien, pour ces nombreuses conversations sur la thèse mais pas seulement et pour son sens critique.

Je remercie très sincèrement les collègues du Bâtiment E et en particulier Sophie Marguier et Vincent Armbruster pour les diverses conversations et bons moments.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à mes parents et ma compagne pour leur soutien.

# Table des matières

Remerciements .....	4
Introduction générale.....	7
I. Contexte de l'étude.....	9
1. Le cancer .....	9
1.1. Définition .....	9
1.2. Tissus épithéliaux.....	10
2. Optique biomédicale .....	11
2.1. Définition .....	11
2.2. Interaction lumière-tissu biologique .....	12
2.2.1. La réflexion spéculaire .....	12
2.2.2. L'absorption.....	13
2.2.3. Diffusion élastique.....	14
3. Conclusion.....	16
II. Données tissulaires : fluorescence.....	17
1. Introduction .....	17
2. La fluorescence .....	17
2.1. Principe .....	17
2.2. Les fluorophores .....	20
2.2.1. Les fluorophores endogènes .....	20
2.2.2. Les fluorophores précurseurs.....	22
2.2.3. Les fluorophores exogènes .....	23
2.3. Instrumentation .....	23
2.3.1. Sources d'excitation .....	23
2.3.2. Sondes fibrées.....	24
2.3.2.1. Fibre optique à saut d'indice .....	24
2.3.2.2. Configuration.....	25
2.3.3. Système d'imagerie par point .....	26
2.3.4. Résolution spatiale.....	31
2.4. Imagerie hyperspectrale .....	38
2.5. Imagerie multimodale .....	41
3. Conclusion.....	44
III. Données structurales : Tomographie optique cohérente .....	45
1. Introduction .....	45
2. Définitions .....	47

3.	Etat de l'art .....	50
3.1.	OCT dans le domaine temporel .....	50
3.1.1.	Origine de l'imagerie optique biologique en temps de vol .....	50
3.1.2.	Réflectométrie à faible cohérence .....	52
3.1.3.	De la réflectométrie à la tomographie optique cohérente .....	54
3.2.	OCT dans le domaine spectral .....	59
3.3.	Comparaison TDOCT / FDOCT .....	60
3.3.1.	Dans le domaine temporel .....	60
3.3.2.	Dans le domaine fréquentiel .....	62
3.3.3.	Avantages / Inconvénients .....	65
3.4.	Scan free OCT .....	67
4.	Principe et architecture du système Scan-free OCT .....	70
4.1.	Source laser supercontinuum .....	71
4.2.	Interféromètre .....	71
4.3.	Détection .....	74
4.4.	Traitement d'image en temps réel .....	77
5.	Dispersion .....	81
6.	Performances .....	86
6.1.	Résolution axiale .....	86
6.2.	Sensibilité .....	87
6.3.	Résolution latérale .....	89
6.4.	Profondeur d'imagerie .....	93
6.5.	Vitesse d'acquisition .....	93
6.6.	Tests sur des échantillons biologiques .....	94
7.	Conclusion .....	98
	Conclusion générale et perspectives .....	99
	Annexe 1 : Publication invitée .....	100
	Annexe 2 : Rapport synthétique d'activité .....	109
	Bibliographie .....	112

## Introduction générale

D'après l'Institut National du Cancer, 365 500 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués en France en 2011 et on estime le coût annuel (soins, prévention, recherche et dépistage) à 30 milliards d'euros. C'est pourquoi le gouvernement français a mis en place le deuxième « Plan Cancer 2009 – 2013 » avec un budget de 750 millions d'euros dont 95 millions pour la recherche. Les principaux enjeux concernés sont la prévention, le diagnostic et la thérapie.

Détecter un cancer à un stade précoce est un enjeu majeur car dans ce cas, les chances de guérison augmentent considérablement, les traitements sont moins agressifs et les coûts diminuent. Il existe différentes techniques de dépistage ; premier degré de la prévention et du diagnostic des cancers. Par exemple pour les cancers du sein une radiographie est effectuée par les centres de radiologie agréés ainsi qu'une double-lecture des mammographies réalisée. Pour les cancers colorectaux les centres de lecture font des tests de recherche de sang occulte dans les selles. Pour les cancers de la cavité buccale (hélas majoritairement détectés à un stade avancé) et les cancers de la peau, les premiers dépistages se font par un examen visuel. Le dermatologue, en complément d'un examen visuel global, utilise un petit microscope portatif en éclairage lumière blanche, parfois polarisée, appelé dermatoscope (ou dermoscope) pour un meilleur dépistage. Les zones suspectes sont ensuite prélevées (biopsies) pour une analyse histo-pathologique qui constitue finalement le seul diagnostic de référence commun à tous les cancers. Pour ces dépistages avec examen visuel, certaines lésions cancéreuses restent indétectables et comme le nombre de biopsies est limité en raison de leur caractère invasif et traumatisant pour le patient, certains tissus cancéreux peuvent échapper au dépistage.

Pour aider au dépistage précoce, l'un des axes de développement prometteur en recherche fondamentale, appliquée et clinique, est l'imagerie des interactions de la lumière avec les tissus biologiques. En effet, la lumière, de manière générale, est un outil potentiellement non invasif et permet suivant les processus mis en jeu de différencier un tissu sain d'un tissu cancéreux [1]. Ce dernier voit sa structure et sa composition modifiées par rapport à un tissu sain [2]. Au fur et à mesure de sa cancérisation, par exemple, la taille des vaisseaux sanguins augmente pour un apport plus important en oxygène et nutriments à la tumeur, la taille des noyaux cellulaires augmente également, la muqueuse devient plus épaisse et la concentration en certaines protéines est modifiée [3]. Toutes ces modifications (structurelles, tissulaires et moléculaires) modifient la réponse du tissu biologique à une excitation lumineuse.

Différents types d'interaction lumière-tissu permettent de caractériser ces modifications. A chaque type d'interaction correspond l'obtention d'information de nature spécifique. Pour ne citer que les principales, nous pouvons préciser les méthodes suivantes :

- La fluorescence permet d'accéder à une information de type tissulaire, essentiellement biochimique, [4]

- La diffusion et la tomographie optique cohérente fournissent des informations respectivement micro-structurales et structurales, [5][6]
- La spectroscopie Raman renseigne sur la composition moléculaire des tissus, [7]
- La microscopie confocale permet à la fois de visualiser des structures et des fluorophores avec une meilleure résolution que l'OCT mais pour des profondeurs de pénétration plus faibles. [8]

Actuellement, les outils développés dans le cadre du dépistage et du diagnostic du cancer ne concernent le plus souvent qu'un seul type d'information. Ainsi, la caractérisation optique des tissus reste perfectible. Il apparaît donc intéressant de disposer, dans un même outil, de plusieurs modalités permettant d'obtenir des informations de nature variée [9], [10].

Au sein de diverses équipes de l'Institut FEMTO-ST plusieurs techniques d'intérêt pour l'imagerie médicale sont développées : les techniques de fluorescence pour des applications médicales et végétales et la tomographie optique cohérente. L'objet de cette thèse est d'aller vers un dispositif multimodal qui couple de façon fonctionnelle d'une part les techniques existantes au laboratoire et d'y associer également de nouvelles fonctionnalités telles que la fluorescence multi-excitation et l'analyse hyperspectrale. Le système OCT développé jusqu'alors au laboratoire n'était pas adapté à l'imagerie de tissus biologiques et c'est pourquoi une partie de cette thèse a porté sur le développement fonctionnel du système OCT, l'analyse de ses performances et son optimisation. Il en est de même pour le passage d'un système de fluorescence classique à une fluorescence multi-excitations et pour l'analyse hyperspectrale.

Dans un souci d'intégration de ces diverses modalités, le but du travail de thèse est également de concevoir un outil simple qui, dans un premier temps, permet d'intégrer la fluorescence multi-excitation et l'analyse hyperspectrale. L'objectif est ensuite d'y ajouter l'OCT comme modalité supplémentaire afin d'obtenir des informations micro-structurales et tissulaires d'un même objet biologique avec les systèmes étudiés.

Le premier chapitre présente le contexte de l'étude. Après avoir présenté les variations de structure et les changements biochimiques entre les tissus sains et cancéreux, les différentes interactions entre la lumière et ces tissus biologiques sont décrites.

Le deuxième chapitre traite des données tissulaires avec la technique d'autofluorescence des tissus. Après une présentation du principe de fluorescence et des différents fluorophores présents dans les tissus, le système d'imagerie hyperspectrale est décrit. Un exemple d'analyse hyperspectrale démontre son importance dans la détermination de la concentration d'une molécule dans un échantillon.

Le troisième chapitre de ce mémoire traite de l'obtention de données structurales en utilisant une technique de tomographie optique cohérente. Un état de l'art présente l'évolution de cette technique en commençant par introduire l'interférométrie puis le principe de base de la tomographie optique cohérente ainsi que certains paramètres caractérisant les performances et le type d'image effectuée. Le système développé au laboratoire est décrit et comparé à d'autres configurations plus connues. Ses principales caractéristiques sont ensuite présentées.

# I. Contexte de l'étude

## 1. Le cancer

### 1.1. Définition

L'être humain est constitué de 60 000 milliards de cellules organisées en tissus, organes et systèmes qui sont constamment renouvelées. L'organisme assure la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaire.

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules provenant d'une perte de l'apoptose (mort cellulaire programmée pour le renouvellement des tissus). Invasive, elle est aussi caractérisée par une perte de la différenciation cellulaire et par sa capacité métastatique, c'est-à-dire sa capacité à migrer vers d'autres organes du corps humain pour y développer une nouvelle tumeur.

Elle se développe sur plusieurs années et les causes répertoriées sont multiples [www.ligue-cancer.net] :

- Antécédents familiaux et gènes de prédisposition
- Surpoids
- Tabagisme, alcools
- Certaines maladies génétiques
- Etc...

Ces causes entraînent une altération du patrimoine génétique en perturbant les mécanismes biologiques associés aux pathologies cancéreuses. Les mécanismes biologiques entraînant un cancer sont principalement les oncogènes (gènes déclenchant une prolifération désordonnée des cellules), un mauvais fonctionnement des gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes de réparation de l'ADN [2].

Il existe deux types de tumeurs :

- La tumeur bénigne : elle est le plus souvent sans gravité. Elle est bien délimitée, ne donne pas de métastase et ne récidive pas après ablation. Elle peut cependant poser problèmes lorsque son volume interfère avec le fonctionnement normal d'un organe (compression, inflammation...) Les grains de beauté sont des tumeurs bénignes constituées de mélanocytes normalement présents dans la peau.
- La tumeur maligne : synonyme de cancer, elle est dangereuse pour l'homme car elle peut envahir et détruire les tissus qui lui sont adjacents et peut se disperser dans tout le corps (métastases).

La majorité des cancers se développent dans l'épithélium dont la moitié dans les organes creux. C'est pourquoi la recherche en optique biomédicale s'effectue sur ces tissus afin de localiser les tumeurs malignes [11], [12].

## 1.2. Tissus épithéliaux

La Figure 1 montre les différents stades d'évolution des tissus épithéliaux cancéreux.

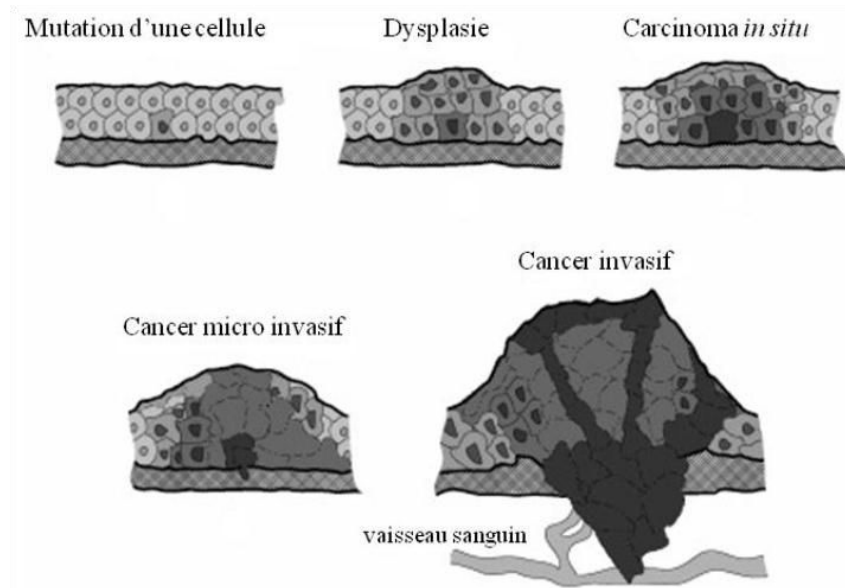


Figure 1 : Représentation simplifiée des différentes étapes d'évolution d'un tissu épithélial cancéreux [13]

Le développement d'un cancer commence par une mutation dans une cellule. Cette modification ne permet plus à la cellule de s'autodétruire. Cette absence d'apoptose entraîne la multiplication cellulaire dans le tissu, c'est la dysplasie.

Le stade suivant, le carcinome *in situ* correspond à une augmentation telle qu'elle entraîne une déstructuration du tissu. Cependant, les cellules tumorales n'ont pas franchi la membrane basale, le développement du cancer est local. Cette étape pré-cancéreuse peut rester à ce stade plusieurs années avant de régresser ou de se transformer en cancer micro invasif.

Les cellules cancéreuses traversent la membrane basale et peuvent ainsi se développer dans les tissus voisins.

Le cancer est dit invasif quand les cellules tumorales atteignent les vaisseaux sanguins permettant un développement du cancer dans tous les organes du corps.

Il est donc important de détecter les lésions cancéreuses le plus tôt possible avec des méthodes adaptées à la caractérisation des tissus épithéliaux.

Pendant la phase de cancérisation, la structure et la composition biochimique du tissu changent. Voici quelques modifications [2] :

- Déstructuration tissulaire.
- Epaississement de la muqueuse.
- Apport plus important en oxygène et en nutriments.

- Augmentation de la taille des noyaux des cellules.
- Modifications de certains éléments : épaissement et densification de la chromatine, surproduction de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène (NADH).

Ces modifications anatomiques et biochimiques modifient les propriétés optiques du tissu devenu cancéreux. Sa réponse face à une excitation lumineuse sera donc différente de celle d'un tissu sain.

## **2. Optique biomédicale**

### **2.1. Définition**

La recherche en optique biomédical consiste à étudier les phénomènes d'interaction lumière-tissu biologique pour des applications médicales.

Un axe de recherche consiste à étudier les effets de la lumière (souvent laser) sur les tissus (effets thermique, photoablatif, photochimique) pour l'aide à la cicatrisation, l'ablation de zones tumorales ou la destruction de cellules en thérapie photodynamique.

Un autre axe de recherche est l'étude des propriétés optiques des tissus comme l'absorption, la diffusion et la fluorescence. Sans endommager les tissus, ces études permettent d'obtenir des informations sur la composition et la structure des tissus afin de déterminer si celui-ci est sain ou cancéreux.

D'autres techniques existent déjà comme l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique ou l'imagerie aux rayons X mais les méthodes optiques présentent des avantages importants. En effet, bien contrôlés, les dispositifs optiques peuvent être sans danger pour les tissus et permettent par l'obtention de spectres particuliers d'avoir des informations pour l'aide au diagnostic. Différentes mesures optiques peuvent être faites simultanément afin d'avoir des informations complémentaires. Si les dispositifs sont relativement plus simples et moins coûteux à réaliser, les principaux inconvénients sont les profondeurs limitées d'analyse et les traitements de données complexes nécessaires pour retrouver les propriétés optiques des tissus (problème inverse, analyse en composantes principales, etc.).

Deux méthodes d'analyse ont été citées, la spectroscopie et l'imagerie optique [14].

La première, comme la mesure de fluorescence et la réflexion diffuse, permet d'analyser des spectres émis par le tissu en réponse à une excitation lumineuse. Elle permet d'obtenir des informations sur la composition des tissus et sur leur structure. Ces systèmes sont le plus souvent fibrés et nécessitent un choix de sources lumineuses en fonction des fluorophores présents dans le tissu analysé. Si les temps de mesure peuvent s'avérer longs (suivant la surface étudiée), les spectres mesurés sont riches d'information et permettent une caractérisation optique des tissus.

La deuxième permettant d'avoir une image 2D ou 3D du tissu comme la tomographie optique cohérente permet d'observer sa structure et de localiser une éventuelle tumeur.



Ces différentes méthodes utilisent plusieurs paramètres optiques des tissus biologiques que sont l'absorption, la diffusion et la réflexion.

## 2.2. Interaction lumière-tissu biologique

Les phénomènes d'interaction entre la lumière et un milieu quelconque (dont les tissus biologiques) qui nous intéressent ici, sont la réflexion spéculaire, l'absorption et la diffusion.

### 2.2.1. La réflexion spéculaire

Un faisceau lumineux qui traverse deux milieux d'indices de réfraction différents subit une réflexion partielle. L'indice de réfraction  $n$  est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et celle dans le milieu.

Une partie de la lumière est donc réfléchi vers le premier milieu et une autre partie passe dans le deuxième milieu dans des directions définies par les lois de Snell-Descartes qui annoncent que :

- Les rayons réfractés (ou transmis) et réfléchis sont dans le même plan d'incidence,
- L'angle du rayon réfléchi par rapport à la normale est équivalent à celui du rayon incident,
- Les indices de réfraction  $n_1$  et  $n_2$  de chacun des milieux et les angles d'incidence  $\theta_i$  et de réfraction  $\theta_{i'}$  sont liés par la relation suivante :

$$n_1 \cdot \sin(\theta_i) = n_2 \cdot \sin(\theta_{i'}) \quad (1)$$

La quantité d'énergie réfléchi dépend de l'angle d'incidence et du rapport entre les deux indices  $n_1$  et  $n_2$ .

Pour une lumière non polarisée, le coefficient de réflexion  $R$  en intensité est donnée par la formule de Fresnel [15] :

$$R = \frac{1}{2} \cdot \left[ \frac{(\tan(\theta_i - \theta_{i'}))^2}{(\tan(\theta_i + \theta_{i'}))^2} + \frac{(\sin(\theta_i - \theta_{i'}))^2}{(\sin(\theta_i + \theta_{i'}))^2} \right] \quad (2)$$

Si l'angle d'incidence  $\theta_i$  est nul, alors  $R$  devient :

$$R = \frac{(n_1 - n_2)^2}{(n_1 + n_2)^2} \quad (3)$$

Le Tableau 1 donne quelques valeurs d'indice des principaux constituants des tissus biologiques. Pour une réflexion à incidence normale avec une interface air ( $n_1 = 1$ ) – tissu biologique ( $n_2 = 1,4$ ), le coefficient de réflexion est  $R \approx 2,8 \%$ .

Milieu	Indice
Eau	1,33
Protéines	1,6
Lipides	1,46
Cytoplasme	1,37
Membranes	1,46
Noyau	1,39
Mélanine	1,7

Tableau 1 : Valeurs d'indice moyennes dans le visible [15]

Plus le saut d'indice est élevé, plus le coefficient de réflexion est important.

Ce sont ces réflexions qui sont détectées par les systèmes de tomographie optique cohérente pour la réalisation d'images 3D.

### 2.2.2. L'absorption

Un faisceau lumineux à la fréquence  $\nu$  est composé de photons d'énergie  $h\nu$  ( $h$  est la constante de Planck). Si cette énergie est égale à la différence d'énergie entre l'état fondamental et un niveau d'énergie supérieur d'une molécule constituante du milieu alors certains photons seront absorbés. Cette molécule est portée à un état dit excité, c'est-à-dire qu'elle se trouve avec un excédent d'énergie. Le retour à l'état fondamental peut s'effectuer de trois manières différentes :

- Par un processus non radiatif, c'est-à-dire sous forme de chaleur
- Par un processus radiatif à partir d'un état singulet, c'est la fluorescence (voir partie II)
- Par un processus radiatif à partir d'un état triplet, c'est la phosphorescence

D'un point de vue macroscopique, ceci se traduit par une perte de puissance lumineuse au fur et à mesure de la traversée dans le milieu. Cette perte d'énergie suit la loi de Beer-Lambert, l'intensité lumineuse  $I(\lambda)$  s'écrit ainsi :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\mu_a(\lambda).l} \quad (4)$$

Avec  $I_0(\lambda)$  l'intensité du faisceau lumineux incident,  $\mu_a(\lambda)$  le coefficient d'absorption linéique et  $l$  la distance parcourue dans le milieu.

Le phénomène d'absorption est aussi défini par l'absorbance  $A$  comme étant :

$$A(\lambda) = \ln\left(\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right) = \mu_a(\lambda).l \quad (5)$$

Dans les tissus biologiques, les principaux composants qui absorbent la lumière visible sont l'hémoglobine et la mélanine. Dans l'infrarouge c'est essentiellement l'eau (Figure 2).

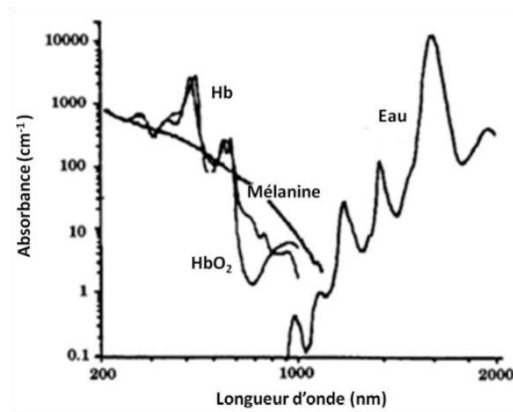


Figure 2 : Courbes d'absorption des principaux fluorophores présents dans les tissus dans le visible (modifiée de [16])

Cette loi permet d'estimer la profondeur de pénétration de chaque fréquence dans le milieu. Elle est définie comme étant la distance pour laquelle il reste 37% ( $1/e$ ) de l'énergie initiale (Tableau 2).

Si l'on souhaite analyser le tissu en profondeur, il est donc indispensable de travailler dans la fenêtre dite « thérapeutique » entre 600 nm et 1300 nm.

Longueur d'onde (nm)	Profondeur ( $\mu\text{m}$ )
250	2
280	1,5
300	6
350	60
400	90
450	150
500	230
600	550
700	750
800	1200
1000	1600
1200	2200

Tableau 2 : Profondeur approximative de pénétration de la lumière dans une peau caucasienne pour laquelle il reste 37% de l'énergie incidente [17]

Dans cette gamme de fréquence, le phénomène d'absorption est minimisé. La diffusion élastique devient le phénomène prédominant.

### 2.2.3. Diffusion élastique

Dans un milieu composé de particules de formes et de tailles variées très peu absorbantes aux fréquences de la lumière qui le traverse, les photons peuvent suivre différentes trajectoires. Ils peuvent suivre leur trajectoire initiale (photons balistiques), être déviés une fois, c'est la diffusion simple ou être déviés plusieurs fois, c'est la diffusion multiple.

Cette interaction entre le photon et une particule du milieu est appelée diffusion élastique quand le photon diffusé a la même énergie (la même fréquence) que le photon incident. Il

existe deux types de diffusion, la diffusion Rayleigh et la diffusion Mie. La première intervient lorsque la taille de la particule est très inférieure à la longueur d'onde du photon. La deuxième intervient lorsque la taille de la particule est proche de la longueur d'onde du photon. La taille moyenne des centres diffuseurs étant micrométrique, c'est la diffusion Mie qui est dominante dans les tissus biologiques.

Comme l'absorption, la diffusion est caractérisée par un coefficient de diffusion  $\mu_s$  permettant de connaître la distance moyenne  $l_s$  parcourue par un photon entre deux diffusions.

$$l_s = \frac{1}{\mu_s} \quad (6)$$

Elle est aussi définie par la fonction de phase  $p(s, s')$  et le facteur d'anisotropie  $g$ .

$p(s, s')$  correspond à la probabilité que la diffusion ait lieu dans la direction  $s'$  ( $s$  étant la direction initiale).  $g$  décrit la distribution de l'intensité de la lumière diffusée en fonction de l'angle  $\theta$  entre les directions  $s$  et  $s'$ .

$$g = \langle \cos(\theta) \rangle \quad (7)$$

Comme le montre la Figure 3, si  $g$  est très proche de 0 alors la diffusion est isotrope, si elle est proche de 1, elle est fortement anisotrope.

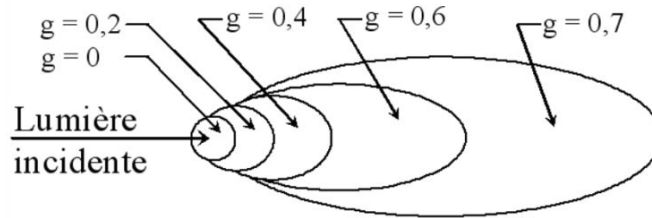


Figure 3 : Diffusion en fonction du facteur d'anisotropie [18]

Dans les tissus biologiques, le facteur d'anisotropie est compris entre 0,7 et 0,99. Il permet de définir le coefficient de diffusion réduit  $\mu'_s$  permettant d'avoir une meilleure estimation de la profondeur  $l'_s$  accessible. Il est défini par :

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (8)$$

### 3. Conclusion

Les trois principaux phénomènes optiques qui interviennent lorsque la lumière traverse un tissu biologique sont la réflexion, l'absorption et la diffusion élastique. Le Tableau 3 présente les valeurs caractéristiques des propriétés optiques des tissus.

Grandeur	Symbole / Expression	Valeur
Indice de réfraction	$n$	1,40
Coefficient d'absorption	$\mu_a$	$0,1 - 10 \text{ cm}^{-1}$
Longueur d'absorption	$l_a = 1/\mu_a$	$1 \text{ mm} - 10 \text{ cm}$
Coefficient de diffusion	$\mu_s$	$100 - 1000 \text{ cm}^{-1}$
Libre parcours moyen de diffusion	$l_s = 1/\mu_s$	$10 - 100 \mu\text{m}$
Coefficient d'anisotropie	$g = \langle \cos \theta \rangle$	$0,7 - 0,99$
Coefficient de diffusion réduit	$\mu_s' = \mu_s(1-g)$	$10 - 100 \text{ cm}^{-1}$
Longueur de diffusion réduite	$l_s' = 1/\mu_s'$	$100 \mu\text{m} - 1 \text{ mm}$
Coefficient de transport	$\mu_t' = \mu_a + \mu_s'$	$10 - 100 \text{ cm}^{-1}$
Libre parcours moyen de transport	$l_t' = 1/(\mu_a + \mu_s')$	$100 \mu\text{m} - 1 \text{ mm}$
Coefficient total d'atténuation	$\mu_{\text{eff}} = [3\mu_a(\mu_s' + \mu_a)]^{1/2}$	$1,5 - 60 \text{ cm}^{-1}$
Longueur d'atténuation	$l_{\text{att}} = 1/\mu_{\text{eff}}$	$0,01 - 0,6 \text{ cm}$

Tableau 3 : Valeurs caractéristiques des propriétés optiques des tissus [15]

Pour des profondeurs faibles ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ), le libre parcours moyen de transport définit la distance pour laquelle les photons ne subissent que de l'absorption et une seule diffusion. Pour des profondeurs plus importantes, elle permet seulement de définir les distances parcourues par les photons balistiques.

Si les fréquences utilisées pour étudier le tissu appartiennent à la fenêtre thérapeutique alors le coefficient de diffusion réduit est très supérieur au coefficient d'absorption. Dans ce cas et pour des profondeurs supérieures à la longueur de diffusion réduite, a été défini le coefficient total d'atténuation  $\mu_{\text{eff}}$  (approximation de la diffusion). Il permet d'estimer l'atténuation de l'énergie par unité de surface (fluence).

Tous ces paramètres et phénomènes optiques dépendent de la taille des particules et de leur composition biochimique composant le tissu biologique. Pendant le développement du cancer, la taille du noyau des cellules devient plus grande et la concentration de certaines molécules change ce qui modifie les propriétés optiques des tissus donc leur réponse à une excitation lumineuse.

La prochaine partie de ce mémoire traite de la fluorescence, phénomène optique intervenant après l'absorption d'énergie lumineuse spécifique et du développement d'un système fibré permettant la mesure de fluorescence des tissus biologiques avec plusieurs sources d'excitation.

## II. Données tissulaires : fluorescence

### 1. Introduction

Les premières études par spectroscopie de fluorescence induite par lumière, sur la caractérisation des tissus et sur la photodétection de cancers, datent de 1924 [19]. Elles concernent la fluorescence de porphyrines endogènes de tumeur sous illumination ultraviolette. En 1942 ont lieu les premières observations de la fluorescence rouge après administration de porphyrines exogènes de tumeur animales [14]. En 1948, la fluoescéine est utilisée pour améliorer la détection et l'identification de tumeurs du cerveau *in vivo* [20]. Dans les années 1950, a été observée l'accumulation d'hématoporphyrine dans plusieurs types de cancer [21], [22], ce qui a donné par la suite l'utilisation par injection d'un dérivé photosensible appelé HpD qui se fixe sur l'hématoporphyrine et permet ainsi de localiser des tumeurs dans les bronches, dans le col de l'utérus, dans la tête et dans le cou [23], [24], [25]. Bien que ces résultats soient obtenus avec des tumeurs à un stade avancé, ils ont permis d'avoir les premières observations de fluorescence d'HpD par cystoscopie en 1976 [14]. Ils ont aussi amorcé le développement d'instruments dédiés à la fluorescence utilisant des détecteurs photoélectroniques à la fin des années 1970 [14].

Cependant, l'HpD présente plusieurs inconvénients. Son temps d'accumulation dans les tissus cancéreux est de plusieurs heures et il induit une photosensibilité de la peau pendant plusieurs semaines après l'injection. Se développent par la suite la recherche d'autres dérivés photosensibles et l'étude de l'auto fluorescence des tissus. Les équipes de recherche de Profio, Alfano [26], Lohmann [27] et Yang [28] sont les pionniers de l'étude *in vitro* et *in vivo* de l'auto fluorescence des tumeurs humaines et animales. Kriegmair montre l'intérêt de l'utilisation de l'ALA (acide 5-aminolévulinique) comme précurseur pour la protoporphyrine IX dans la vessie [29]. Les avantages cliniques potentiels des techniques de fluorescence sont une haute sensibilité, surtout si la mesure est effectuée point par point ; une grande flexibilité grâce à l'utilisation de fibres optiques ; la réduction du nombre de biopsies aléatoires et son utilisation relativement simple par un clinicien.

Dans la première partie de ce chapitre est présenté le principe de la fluorescence et les différentes techniques de mesure et de détection de tumeur.

La deuxième partie présente le système développé au laboratoire.

### 2. La fluorescence

#### 2.1. Principe

La fluorescence est un phénomène d'émission lumineuse due à l'absorption d'un rayonnement spécifique par une molécule. Celle-ci ne peut exister que dans un certain nombre d'états d'énergie discrets correspondant à des configurations électroniques données. Le mécanisme quantique de ce phénomène physique est traduit par des étapes de transition énergétique schématisées par le diagramme de Jablonsky (Figure 4).

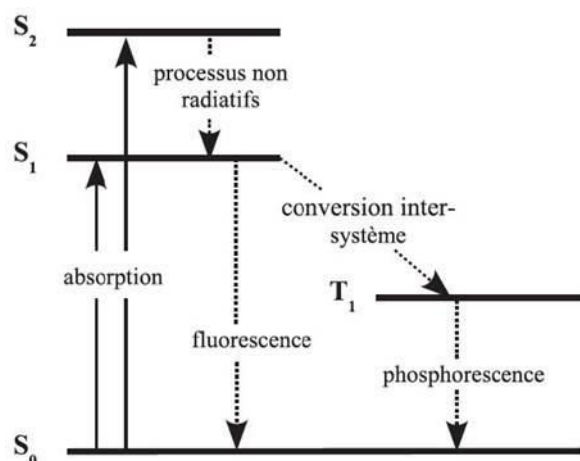


Figure 4 : Diagramme de Jablonsky simplifié représentant les différentes transitions énergétiques possibles entre les états singulets S<sub>0</sub> (état stable), S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> (états excités) et l'état triplet T<sub>1</sub>.

La molécule est dite dans son état fondamental ou stable lorsque l'énergie du cortège électronique est la plus faible.

Comme écrit précédemment (partie I), l'absorption a lieu si le photon, émis par une source d'excitation lumineuse, possède une énergie égale à l'énergie entre l'état stable et un état excité de la molécule. Cette dernière passe de son état fondamental à un niveau d'énergie électronique supérieur. Ces niveaux d'énergie sont par nature instables.

La molécule, dite excitée, est le siège d'une série de réactions jusqu'à son retour à l'état stable. Ces réactions permettent à cette molécule de se débarrasser de son surplus énergétique pour retrouver son état fondamental. Cette dépense d'énergie se fait de plusieurs manières :

- Elle peut s'effectuer par émission de chaleur ou par transfert vers un autre fluorophore. Par transition non radiative, la molécule passe de l'état S<sub>2</sub> à l'état S<sub>1</sub>.
- Elle s'effectue ensuite par transition radiative, c'est-à-dire en émettant un photon d'énergie égale à celle entre l'état S<sub>1</sub> et l'état fondamental. C'est le phénomène de fluorescence. L'énergie émise par fluorescence est donc plus faible que l'énergie des photons incidents. Les longueurs d'onde émises par fluorescence sont donc plus grandes que les longueurs d'onde excitatrices.
- Elle peut également s'effectuer en passant par l'état triplet T<sub>1</sub> par une conversion intersystème. La transition radiative qui survient par la suite passant la molécule de l'état T<sub>1</sub> à l'état fondamental est appelée phosphorescence. Si sa durée d'émission est bien plus longue que la fluorescence (jusqu'à une seconde contre quelques nanosecondes), sa probabilité est nettement inférieure d'un facteur 10<sup>5</sup> à 10<sup>9</sup>.

L'efficacité avec laquelle la lumière est absorbée à la longueur d'onde  $\lambda$  par un milieu absorbant est caractérisée par l'absorbance :

$$A(\lambda) = \mu_a(\lambda) \cdot l = 2,3 \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot C \quad (9)$$

Avec  $\varepsilon(\lambda)$  ( $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) le coefficient d'absorption moléculaire ou d'extinction molaire,  $l$  (cm) le trajet optique et  $C$  ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) la concentration.

Suivant la loi de Beer-Lambert, l'intensité absorbée par le milieu peut s'exprimer ainsi :

$$I_A(\lambda) = I_0(\lambda) - I_T(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot (1 - e^{-2,3\varepsilon(\lambda).l.C}) \quad (10)$$

Avec  $I_0$  l'intensité incidente et  $I_T$  l'intensité transmise par le milieu.

Si l'absorbance est très petite devant 1 alors par développement limité, on obtient :

$$I_A(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 2,3 \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot C \quad (11)$$

L'efficacité de fluorescence pour une molécule donnée est déterminée par le rendement quantique  $\Phi_F$  qui est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Il décrit l'efficacité d'excitation d'un fluorophore. L'intensité de fluorescence  $I_F$  s'exprime ainsi :

$$I_F(\lambda) = \Phi_F(\lambda) \cdot I_A(\lambda) = 2,3 \cdot I_0(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \Phi_F(\lambda) \cdot l \cdot C \quad (12)$$

Avec  $\varepsilon(\lambda) \cdot \Phi_F(\lambda)$  définie comme étant la brillance.

La Figure 5 montre que pour une absorbance très faible ( $A(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0}{I_{\lambda_0}} < 0,05$ ), on peut considérer que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'intensité lumineuse incidente. Au-delà elle suit la loi de Beer-Lambert.

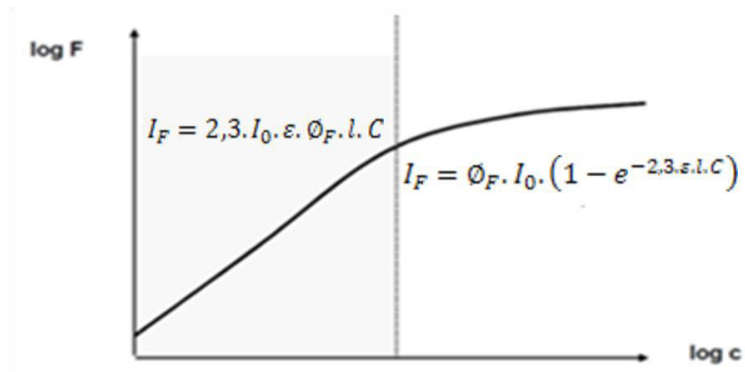


Figure 5 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration [30].

Les fluorophores sont également caractérisés par la durée de vie  $\tau_F$  de l'émission de fluorescence. Elle est définie par le temps moyen que le fluorophore a passé dans son état excité.

Le Tableau 4 présente ces paramètres pour quelques fluorophores présents dans les tissus biologiques.



	Absorption maximale (nm)	$\varepsilon(\lambda) \cdot 10^{-3}$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Fluorescence maximale (nm)	$\phi_F$	$\tau_F$ (ns)	Brillance
Tryptophane	280	5,6	348	0,2	2,6	1120
Tyrosine	274	1,4	303	0,14	3,6	196
Adénine	260	13,4	321	$3 \cdot 10^{-4}$		4
NADH	340	6,2	470	0,019	0,4	118

Tableau 4 : Propriétés de fluorescence de fluorophores présents dans les tissus biologiques [15]

Avant de mesurer la fluorescence d'un tissu biologique, il est donc important de connaître les différents composants du tissu susceptibles de fluorescer et de connaître leurs caractéristiques optiques pour les exciter le mieux possible afin d'obtenir une intensité de fluorescence détectable.

## 2.2. Les fluorophores

Il existe trois types de fluorophores qui sont :

- Les fluorophores endogènes : naturellement présents dans les tissus biologiques
- Les fluorophores précurseurs : ce sont des fluorophores endogènes synthétisés administrés dans le corps,
- Les fluorophores exogènes : non présents dans les tissus biologiques, ils sont administrés dans le corps.

### 2.2.1. Les fluorophores endogènes

De nombreux fluorophores sont naturellement présents dans les tissus biologiques (Figure 6). Certains sont liés à la structure du tissu comme le collagène et l'élastine, et d'autres sont impliqués dans les processus métaboliques des cellules comme le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et les flavines.

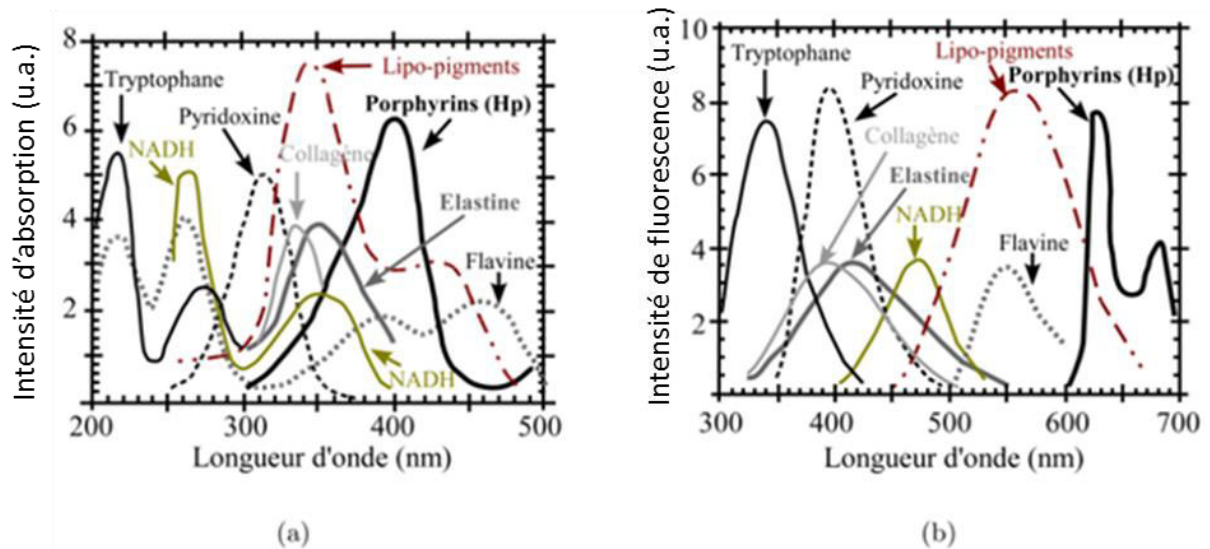


Figure 6 : Spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de fluorophores endogènes ( modifié de [14])

Pour des études cliniques, il est important de noter que :

- Chaque fluorophore possède ses propres spectres d'absorption et d'émission.
- Un tissu biologique contient un mélange de plusieurs fluorophores à différentes concentrations.
- La distribution des fluorophores dans le tissu n'est pas homogène, en particulier dans l'axe de la profondeur du tissu. C'est particulièrement vrai dans les organes internes comme les bronches et le gros intestin qui sont composés de couches bien distinctes (muqueuse, sous muqueuse, musculuse), chaque couche présentant une composition de fluorophores qui lui est propre.

Aussi la détection de cancers à un stade précoce par autofluorescence dépend de :

- La concentration du fluorophore et sa distribution spatiale
- De la forme de la molécule. Par exemple le NADH ne fluoresce que dans sa forme réduite
- L'environnement biochimique et biophysique du tissu qui peut modifier le rendement quantique par exemple.
- L'architecture du tissu comme l'épaisseur de la muqueuse ou les déstructurations des différentes couches qui peuvent modifier les contributions des fluorophores et modifier l'atténuation dépendante de la longueur d'onde à cause par exemple de l'augmentation en concentration de l'hémoglobine.

<b>Fluorophores endogènes</b>	<b>Longueur d'onde d'absorption maximale (nm)</b>	<b>Longueur d'onde de fluorescence maximale (nm)</b>
<b>Acides aminés</b>		
Phénylalanine	260	280
Tyrosine	275	300
Tryptophane	280	350
<b>Protéines élastiques et fibreuses</b>		
Elastine	290, 325	340, 400
Collagène	325, 360	400, 405
<b>Enzymes et coenzymes</b>		
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
FAD, Flavines	450	535
<b>Vitamines</b>		
Vitamine A	327	510
Vitamine K	335	480
Vitamine D	390	480
<b>Lipides</b>		
Céroïde	340 – 395	430 – 460, 540
Lipofuscine	340 – 395	540, 430 – 460
Phospholipides	436	540, 560
<b>Porphyrines</b>	400 – 450	630, 690

*Tableau 5 : Longueurs d'onde des pics d'absorption et de fluorescence de fluorophores endogènes [31]*

Le Tableau 5 rassemble des fluorophores endogènes avec leur longueur d'onde d'excitation et leur longueur d'onde d'émission maximales rapportées par Ramanujam en 2000 [31].

### *2.2.2. Les fluorophores précurseurs*

L'acide 5-aminolevulinique (ALA) est le premier composé intermédiaire de la biosynthèse des porphyrines, qui conduit à l'hème chez les mammifères et à la chlorophylle chez les plantes. Si l'ALA est introduit comme composé chimique exogène dans le tissu, il induit une augmentation de la synthèse d'hème jusqu'à la formation du fluorophore protoporphyrine IX (PpIX). C'est l'effet d'un fluorophore précurseur. Comme les fluorophores exogènes, l'avantage de ce genre de phénomène est que les propriétés optiques de la PpIX sont connues. Par contre, il faut compter plusieurs heures entre l'administration d'ALA et le moment optimal pour la mesure de fluorescence [32] et la PpIX photoblanchit rapidement dans le tissu, c'est-à-dire qu'une perte de fluorescence est observée au bout d'un temps d'excitation relativement court [33]. De plus, si la concentration en PpIX est différente entre des tissus sains et cancéreux, elle peut aussi l'être dans la structure d'un tissu sain. C'est pourquoi des recherches sont menées pour utiliser des précurseurs plus efficaces comme des variantes de

l'ALA. Par exemple, l'ALA-hexyl-ester (h-ALA) a été utilisée cliniquement pour la détection de carcinomes dans la vessie par imagerie de fluorescence [34]. Les études montrent que h-ALA est plus efficace en termes de dosage et de temps d'instillation.

### 2.2.3. *Les fluorophores exogènes*

Les fluorophores exogènes ont dans un premier temps été développés pour la photothérapie dynamique (PDT) qui consiste à irradier une partie du tissu pour tuer les cellules malades. Le fluorophore administré se fixe sur les cellules malades. Une irradiation adaptée sur la cellule malade entraîne une réaction photo-chimique détruisant la cellule.

L'avantage des fluorophores exogènes est qu'ils peuvent être synthétisés pour fixer une cible précise de manière efficace. Mais l'avantage le plus remarquable est l'intensité du signal de fluorescence qui est bien supérieure à celle des fluorophores endogènes, ce qui facilite la mesure et peut permettre de simplifier l'instrumentation nécessaire.

A l'inverse, leur utilisation augmente les risques de toxicité. Un temps est nécessaire entre l'administration du fluorophore et la mesure ; ce temps n'est pas le même suivant le tissu analysé [35].

Cependant, des recherches sont aussi menées pour le développement de fluorophores non toxiques comme l'EtNBA [36] et les carotenoporphyrines [37], [38].

Quelques fluorophores très peu toxiques sont utilisables cliniquement comme la fluorescéine pour l'imagerie de tumeur [39] mais elle est soluble dans l'eau et peut disparaître rapidement dans les tissus *in vivo*.

## 2.3. Instrumentation

Le principe est d'exploiter le contraste optique entre l'autofluorescence ou la fluorescence exogène entre une tumeur et un tissu normal. Ce contraste dépend de la brillance de la fluorescence, de sa forme spectrale et de sa durée de vie (pour l'étude du déclin de fluorescence au cours du temps). Pour chaque application clinique est dédié un système spécialisé. Ces systèmes de mesures sont composés de sources lumineuses filtrées continues ou pulsées, d'un système de détection par point ou par imagerie et d'un ou plusieurs détecteurs.

### 2.3.1. *Sources d'excitation*

Le choix des sources d'excitation dépend des cibles étudiées. En effet, chaque fluorophore possède une bande de longueur d'onde d'excitation spécifique. Celle-ci peut recouvrir une autre bande de longueur d'onde spécifique à un autre fluorophore. Il est donc nécessaire d'avoir une source à largeur de bande suffisamment étroite pour cibler un seul fluorophore.

Pour cela, les deux sources les plus utilisées sont les lasers et les lampes filtrées.

Les sources lasers sont quasi monochromatiques et fournissent de grandes brillances. La cohérence spatiale et donc la directivité du faisceau permettent d'injecter la lumière de manière très efficace dans une fibre optique limitant ainsi les pertes d'injection dans le système. De plus, ce sont des sources qui peuvent fonctionner en continu ou en impulsions, c'est-à-dire qu'elles peuvent émettre des impulsions à une fréquence choisie pour la mesure de temps de vie de la fluorescence. Le principal inconvénient est le prix de ces sources (quelques milliers d'euros), surtout lorsque l'on souhaite avoir plusieurs sources d'excitations pour l'étude de plusieurs fluorophores.

Les lampes sont beaucoup moins chères mais émettent un spectre large. Il faut les associer à un filtre passe bande permettant la sélection d'une largeur de bande étroite. Le grand avantage de ces sources est qu'une seule peut être utilisée pour exciter plusieurs fluorophores, en associant le filtre adéquat. Elle permet aussi d'étudier la réflectance diffuse en utilisant un filtre passe bande large. Les inconvénients de ce type de source sont une faible puissance une fois filtrée spatialement et spectralement et une utilisation seulement en mode continu.

Les diodes électroluminescentes sont encore peu utilisées pour la mesure d'autofluorescence. En effet, les principaux défauts sont la difficulté d'injection dans les fibres et leur faible puissance d'émission. Cependant, elles ont les avantages d'être très peu coûteuses et très peu encombrantes, ce qui permet de mettre en place à moindre coût un système de source multi-excitation comme proposé par Hart et al. en 2002 [40].

### 2.3.2. Sondes fibrées

#### 2.3.2.1. Fibre optique à saut d'indice

La sonde composée de fibres optiques est un élément important pour la mesure spectroscopique car les caractéristiques des fibres utilisées (ouverture numérique, diamètre) et les distances inter-fibres influent sur les profondeurs analysées du tissu et sur le nombre de photons détectés.

La fibre optique est en partie caractérisée par son ouverture numérique  $ON$  et son diamètre de cœur. L'ouverture numérique dépend des indices de réfraction du cœur  $n_{cœur}$  et de la gaine  $n_{gaine}$  de la fibre :

$$ON = n_{milieu} \cdot \sin(\alpha) = \sqrt{n_{cœur}^2 - n_{gaine}^2} \quad (13)$$

Avec  $\alpha$  le demi-angle d'ouverture.

Les fibres les plus utilisées dans la littérature présentent une ouverture numérique de 0,22 ce qui, dans l'air, conduit à un angle de divergence de 12,7°. Comme le montre la Figure 7, cela signifie que si on se place à 200  $\mu\text{m}$  de la fibre constituée d'un cœur de diamètre 200  $\mu\text{m}$  avec une ouverture numérique de 0,22 alors la taille du faisceau est d'environ 290  $\mu\text{m}$ .

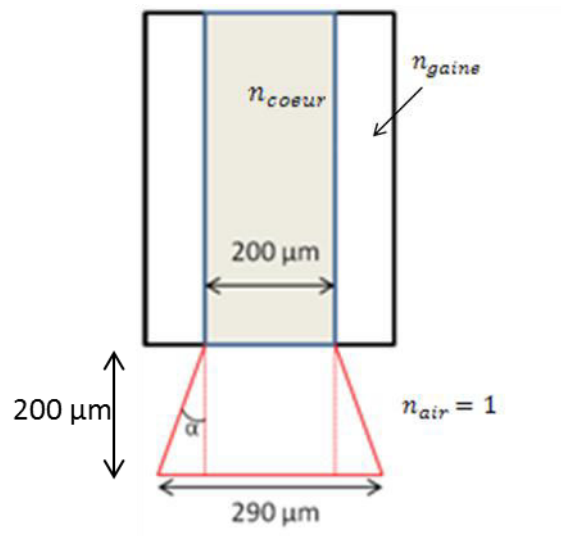


Figure 7 : Schéma d'une fibre optique multimode

#### 2.3.2.2. Configuration

Différentes configurations de sondes multi-fibrées ont été étudiées afin d'optimiser l'acquisition des spectres de diffusion ou d'autofluorescence et de sonder différentes profondeurs de l'échantillon.

La sonde la plus simple à mettre en œuvre est celle utilisant une seule fibre à la fois excitatrice et collectrice. Cette configuration permet d'illuminer le tissu avec une taille de spot le plus petit et d'obtenir des spectres qui ne dépendent pas de la géométrie de la sonde. L'efficacité de collection de la lumière est aussi efficace [41]. L'inconvénient est que la mesure est composée (en plus du spectre d'intérêt) de la réflexion de la lumière d'excitation et de l'autofluorescence de la fibre induite par cette même lumière. C'est pourquoi il est préférable de séparer l'excitation de la réception en utilisant plusieurs fibres pour minimiser ces signaux parasites. De plus il a été prouvé que l'utilisation d'une sonde multi-fibres augmente la spécificité et la sensibilité pour des études diagnostiques [42], [43].

La distance  $r_{sd}$  entre la fibre excitatrice et les fibres réceptrices a une influence sur la profondeur maximale  $z_{max}$  analysable de l'échantillon. En effet il a été montré que dans un milieu principalement diffusant, la trajectoire des photons la plus probable est celle montrée par la Figure 8 [44].

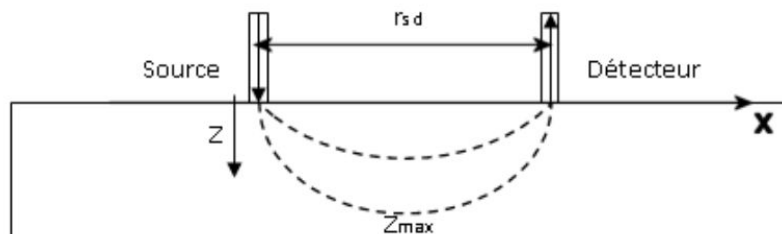


Figure 8 : Présentation schématique de la distribution spatiale des photons (« Banana Shape ») dans un milieu semi-infini [44]

La profondeur maximale  $z_{max}$  se situe entre les deux fibres à une distance de  $\frac{r_{sd}}{2}$  de la fibre excitatrice et s'exprime ainsi [44] :

$$z_{max} = \frac{r_{sd}}{2\sqrt{2}} \quad (14)$$

La complexité structurelle des tissus biologiques ne permet pas de déterminer une distance inter-fibres optimale. Plus la distance inter-fibres est grande, plus la profondeur analysée est grande par contre, l'intensité de la lumière collectée et l'efficacité de la sonde sont plus faibles.

Pour la mesure de fluorescence, il est intéressant de travailler avec des fibres réceptrices possédant une grande ouverture numérique afin d'augmenter la zone superposée entre le cône d'illumination et les cônes de réception. Il a été montré que l'intensité de fluorescence augmente significativement sans influencer sur l'origine de la fluorescence détectée en augmentant l'ouverture numérique jusqu'à 0,4 [45].

### 2.3.3. Système d'imagerie par point

La Figure 9 montre un schéma du système de mesures multimodales fibré.

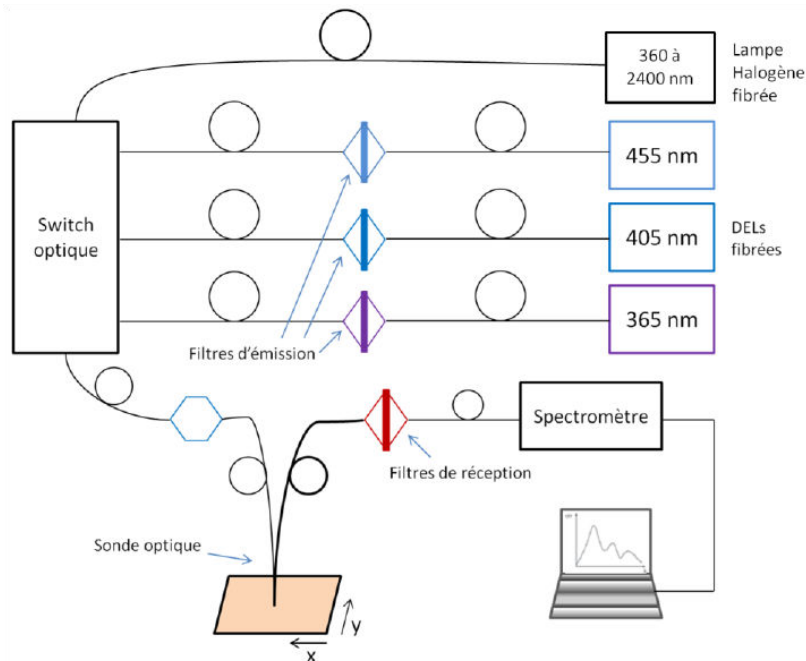


Figure 9 : Schéma de principe du système d'imagerie

Il peut être décomposé en 4 parties :

- Sources d'excitations : trois diodes électroluminescentes pour la mesure de spectres de fluorescence et une lampe halogène pour la mesure de spectre de diffusion.
- Un commutateur optique permettant de changer de source d'excitation.

- La sonde multi-fibres qui permet d'illuminer le tissu et de collecter les signaux de fluorescence, de réflexion et de diffusion.
- Ensemble Spectromètre et Ordinateur pour l'acquisition des données.

### **Les sources d'excitation**

Le système est composé de trois diodes électroluminescentes fibrées (DEL) comme sources d'excitation pour la fluorescence émettant à :

- 365 nm pour l'excitation du NADH, du collagène, d'élastine et des lipo-pigments
- 405 nm pour l'excitation des porphyrines
- 455 nm pour l'excitation des flavines

Elles sont commercialisées avec une puissance, en sortie de fibre de diamètre de cœur 400  $\mu\text{m}$  avec une ouverture numérique de 0,39, respectivement de 4 mW, 3.7 mW et 11 mW.

Afin de récupérer un maximum de puissance de ces sources, elles sont connectées à des fibres optiques de diamètre de cœur de 600  $\mu\text{m}$  et une ouverture numérique de 0,39. Ainsi les puissances mesurées en sortie de fibre sont respectivement de 15 mW, 6 mW et 40 mW.

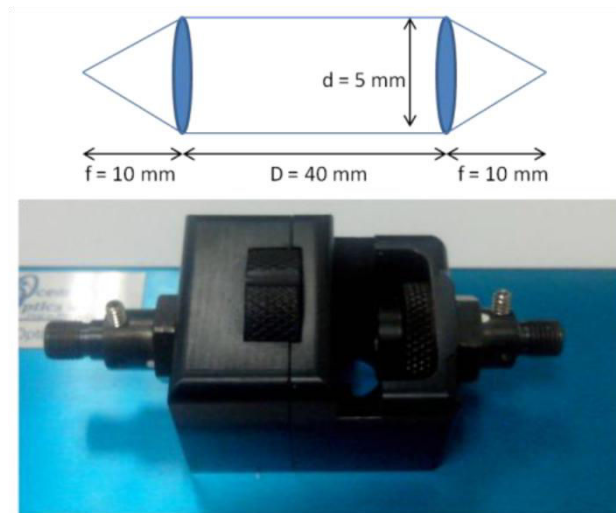
La lumière est ensuite filtrée par des filtres interférentiels permettant la maîtrise de la largeur spectrale. En effet, les largeurs des spectres des sources mesurées sont :

- A 365 nm : 350 – 390 nm
- A 405 nm : 385 – 430 nm
- A 455 nm : 425 – 500 nm

Bien que l'intensité aux extrémités des largeurs spectrales soit plus faible, elle reste suffisante pour être mesurée au spectromètre, en même temps que la fluorescence. Il est donc nécessaire d'ajouter des filtres interférentiels.

Pour la source UV, le filtre d'une largeur de bande à mi-hauteur de 16 nm a une transmission supérieure à 93 % de 360 nm à 372 nm. Le filtre pour la diode à 405 nm a une largeur de bande à mi-hauteur de 14 nm avec une transmission supérieure à 87 % de 400 nm à 410 nm. Le filtre pour la diode à 455 nm possède une largeur de bande à mi-hauteur de 55 nm avec une transmission supérieure à 90 % de 432 nm à 482 nm. Ces filtres sont fixés sur des porte-filtres composés d'une lentille de collimation et d'une lentille de focalisation (Figure 10). Ces lentilles, en silice fondue, fonctionnent pour des longueurs d'onde allant de 200 nm à 2000 nm. Avec un diamètre de 5 mm, leur distance focale est de 1 cm.





*Figure 10 : Porte filtre Ocean Optics*

Ces porte-filtres sont plutôt adaptés pour être connectés avec des fibres optiques de diamètre de cœur 200  $\mu\text{m}$  et une ouverture numérique de 0,22. En effet, avec une fibre de diamètre de cœur 600  $\mu\text{m}$  et une ON de 0,39, on obtient beaucoup de pertes.

Pour une telle ON, la divergence du faisceau est de  $23^\circ$ , ce qui donne une taille de spot, à une distance de 1 cm, de 9 mm alors que la lentille a un diamètre de 5 mm. Si l'on considère que la répartition de l'énergie est homogène, la perte est d'environ 70%. La puissance lumineuse du faisceau en sortie du porte filtre est, par conséquent, égale à 30% de la puissance d'entrée. Le cône de focalisation correspond à une ouverture numérique de 0,24. L'utilisation d'une fibre avec une ON égale à 0,22 en sortie, entrainera encore une légère perte. Cependant, le gain de puissance en sortie de la source lumineuse avec une fibre de diamètre 600  $\mu\text{m}$  et une ON de 0,39 par rapport à une fibre de même ouverture mais d'un diamètre de 400  $\mu\text{m}$  est tel qu'il compense ces pertes. En effet, ce changement de fibre permet d'avoir 2 fois plus de puissance pour la source à 365 nm et 405 nm et 3 fois plus pour la source à 455 nm. Il reste donc préférable de travailler avec des fibres de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Pour la mesure de spectres de diffusion, une lampe au tungstène-halogène d'une puissance totale de 5 W est utilisée. Son spectre d'émission est compris entre 360 nm et 2400 nm. Elle est directement connectée au commutateur à fibres optiques.

### **Commutateur à fibres optiques**

Pour chaque source, la lumière est ensuite guidée dans un commutateur à fibres qui permet par pilotage informatique de choisir la source d'excitation qui illumine le tissu. Il est composé de 5 fibres multimodes de diamètre de cœur de 200  $\mu\text{m}$  et d'ouverture numérique 0,22. Les pertes annoncées induites par ce système sont de 1,4 dB soit une perte d'environ 27,6 %.

Un connecteur est utilisé pour relier la fibre de sortie du commutateur à la sonde optique.

### **Sonde optique**

La lumière de la source choisie est ensuite injectée dans un bundle composé de sept fibres

comme le montre la Figure 11.



*Figure 11 : dessin du bundle de fibre, (E) fibre excitatrice, (C) fibres collectrices*

La fibre centrale illumine l'échantillon et les 6 fibres périphériques collectent la lumière émise par le tissu. Plusieurs bundles sont utilisables au laboratoire avec des fibres de diamètre de 200  $\mu\text{m}$  ou 400  $\mu\text{m}$  et une ouverture numérique de 0,22. La sonde est fixée sur des platines motorisées XY et une platine manuelle Z pour faire un balayage de points de mesures pour une visualisation 2D de l'échantillon.

### **Porte échantillon**

L'échantillon est placé dans un porte-échantillon qui permet d'apposer une lamelle de microscope d'épaisseur 160  $\mu\text{m}$  sur le tissu pour que la mesure s'effectue sur un échantillon plan. La distance sonde-échantillon ne varie ainsi pas durant le balayage.

La lumière collectée est guidée vers un filtre passe haut qui coupe les longueurs d'onde excitatrices réfléchies par le tissu et plus intenses que l'autofluorescence.

### **Micro-spectromètre**

Le signal est ensuite mesuré par un micro spectromètre connecté par USB à un ordinateur. Il permet de réaliser des acquisitions dans la bande spectrale 345 nm – 1040 nm avec un temps d'intégration paramétrable de 3,8 ms à 10 s. Sa compacité permet d'avoir un système portable (Figure 12).

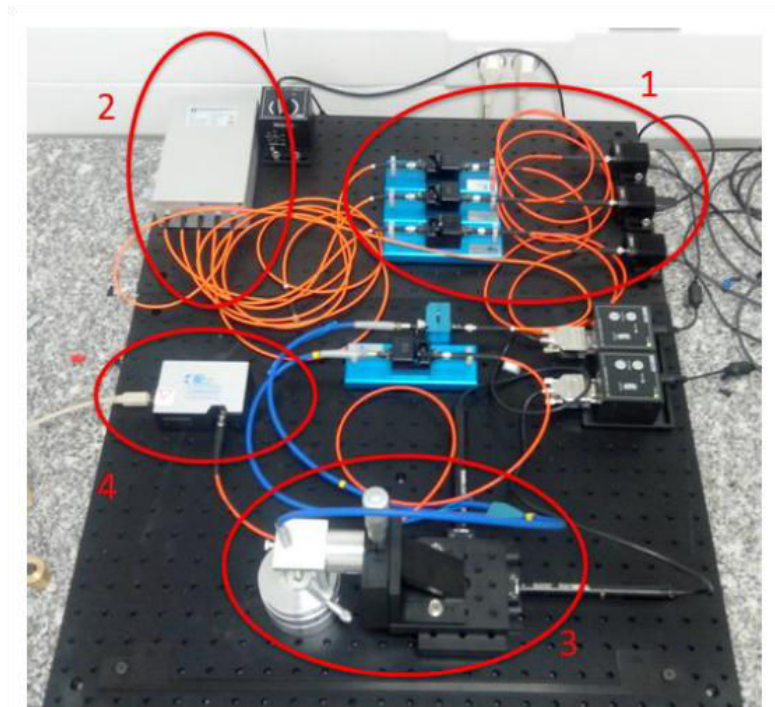


Figure 12 : Photo du banc de mesure, 1 : Sources d'excitations, 2 : Commutateur de fibres optiques, 3 : Systèmes de scan, 4 : Spectromètre

Le signal est acquis avec un logiciel programmé en Labview qui permet l'enregistrement du signal et le déplacement des platines motorisées. Le traitement des données est ensuite réalisé avec Matlab.

L'interface permet de positionner l'échantillon puis d'entrer les paramètres de balayage, le pas et la distance en X et Y. Le bouton spectre permet de visualiser la mesure spectrale en temps réel et d'adapter le temps d'intégration. Nous présentons ci-dessous quelques résultats expérimentaux obtenus à partir de feuilles de houx.

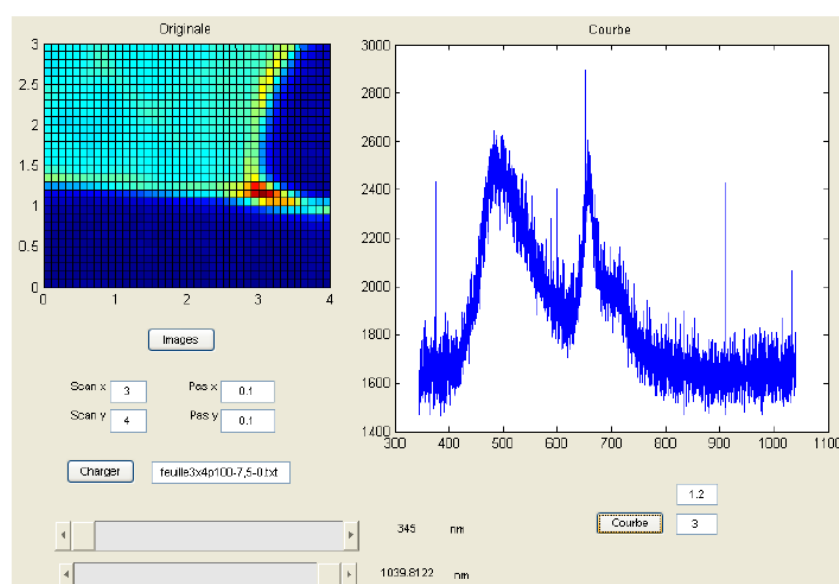


Figure 13 : Visualisation des données

La Figure 13 montre une partie de l'interface permettant de visualiser, à gauche, l'ensemble des points de mesures et le spectre d'un point sélectionné à droite.

La Figure 14 montre l'autre partie qui permet de lisser par interpolation l'image obtenue.

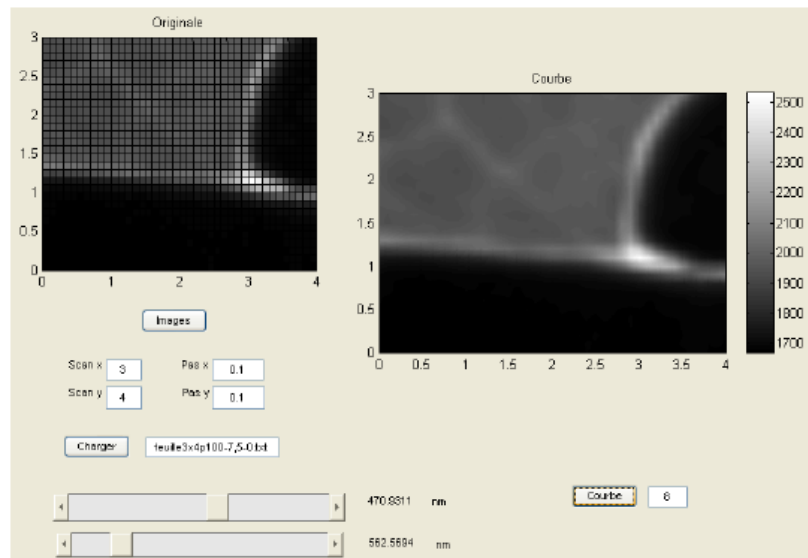


Figure 14 : Interpolation des données

Afin de mesurer la résolution spatiale du système développé, nous avons réalisé une image en réflexion d'une mire USAF 1951 (Figure 15). Alors que le diamètre des fibres du bundle utilisées est de 200  $\mu\text{m}$ , le système permet de résoudre des traits de 50  $\mu\text{m}$  de largeur.

Pour comprendre ce résultat, un modèle géométrique du capteur a été élaboré puis appliqué sur un objet numérique test (du même type que la mire USAF 1951) imagé en réflexion.

#### 2.3.4. Résolution spatiale

Des images de la mire USAF 1951 sont réalisées pour déterminer la résolution spatiale de notre système. La source lumineuse utilisée est un laser émettant à 405 nm. La distance sonde-mire est de 100  $\mu\text{m}$ . Un balayage est réalisé de 1,175 mm x 0,8 mm avec un pas de 25  $\mu\text{m}$  dans les deux directions afin d'imager les 3 premiers éléments du groupe 3 de la mire USAF 1951. L'image interpolée obtenue est présentée dans la Figure 15.

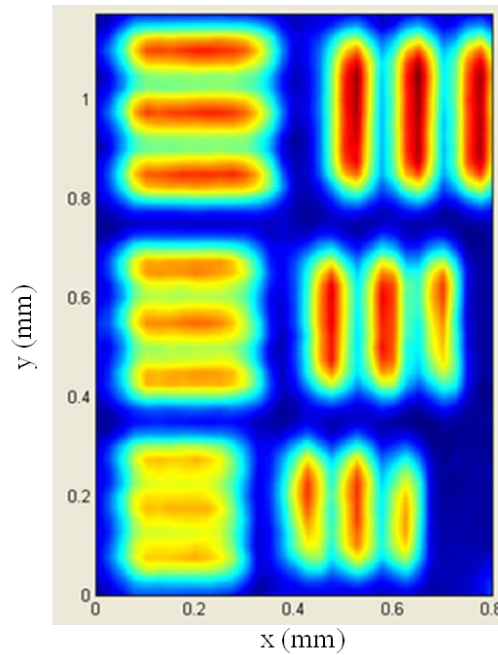


Figure 15 : image des 3 premiers éléments du groupe 3 d'une mire USAF 1951

La résolution spatiale n'est pas la même dans les deux directions (Figure 16). La largeur des traits de l'élément 3 est de  $49,50 \mu\text{m}$ . Sur l'axe horizontal, ces traits sont bien résolus alors que sur l'axe vertical, ils ne le sont pas.

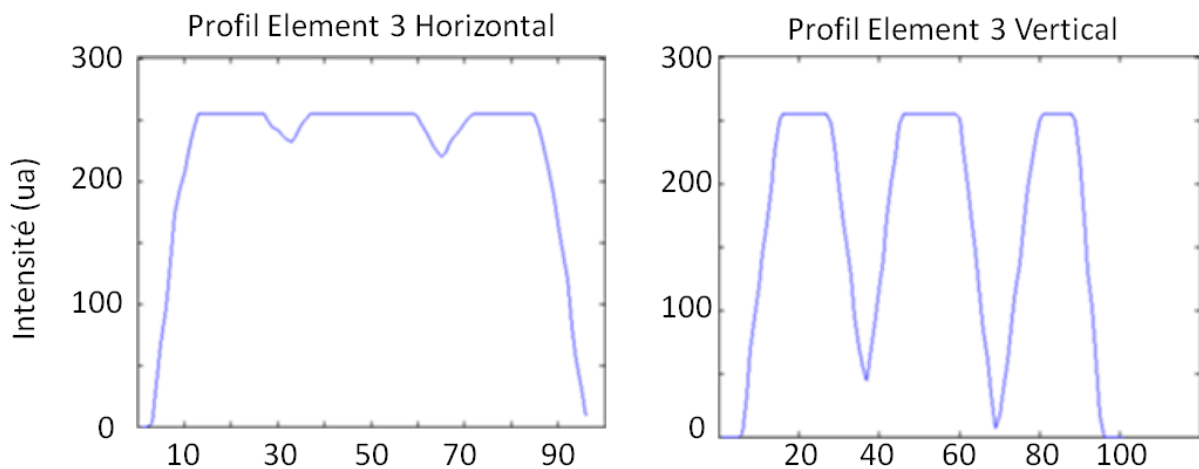
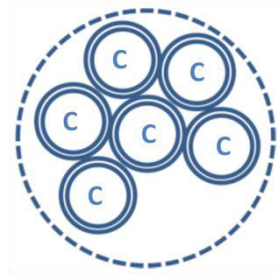


Figure 16 : Profils obtenus de l'élément 3 du groupe 3 de la mire ; à gauche, traits horizontaux ; à droite, traits verticaux

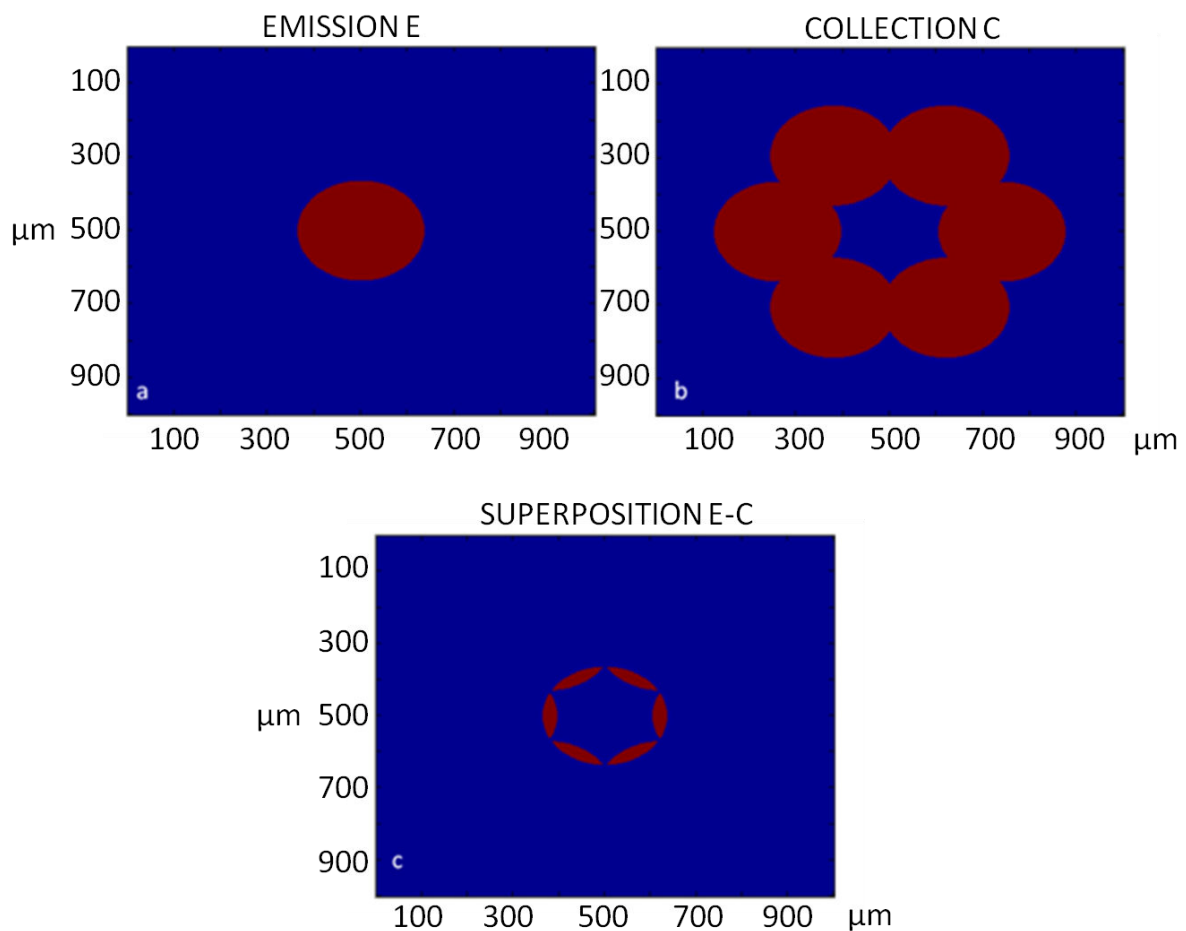
Cela est dû au système de détection qui n'est pas centro-symétrique. En effet, les 6 fibres collectrices sont disposées en sortie comme indiqué par la Figure 17 (en entrée, le capteur est centro-symétrique). Nous comprenons bien que la disposition de la face de sortie du capteur au regard de la fente d'entrée du spectroscopie est essentielle.



*Figure 17 : Agencement des 6 fibres collectrices (C) en sortie du bundle et qui est mis en regard de la face d'entrée du spectromètre*

Ces fibres sont connectées au spectromètre qui possède une fente d'une largeur de 25  $\mu\text{m}$ , nécessaire pour avoir une résolution spectrale de 1 nm pour l'analyse hyperspectrale.

Un modèle a été développé afin d'étudier les relations entre les caractéristiques géométriques du capteur et leurs effets sur le potentiel imageur du dispositif. Il permet de générer la lucarne d'entrée du système correspondant à la superposition de la zone illuminée par la fibre émettrice et de la zone imagée potentiellement par les 6 fibres collectrices à une distance entre la sonde et l'objet de 160  $\mu\text{m}$ .



*Figure 18 : Modèle de la sonde avec une distance de 160  $\mu\text{m}$  entre les fibres et l'échantillon, (a) zone illuminée par la fibre émettrice sur l'échantillon ; (b) la zone imagée potentiellement par les fibres collectrices ; (c) superposition des deux zones.*

A partir de la lucarne d'entrée visible sur la Figure 18, nous avons simulé une image obtenue

en réflexion avec notre système. L'objet test est imaginé à partir de la mire USAF 1951. Il s'agit d'une succession de trois traits distants d'environ 100  $\mu\text{m}$  et de taille variant de 1  $\mu\text{m}$  à 40  $\mu\text{m}$ . Nous avons ensuite convolué l'objet test numérique avec la lucarne d'entrée de la Figure 18, ceci amenant à l'image présentée à droite dans la Figure 19.

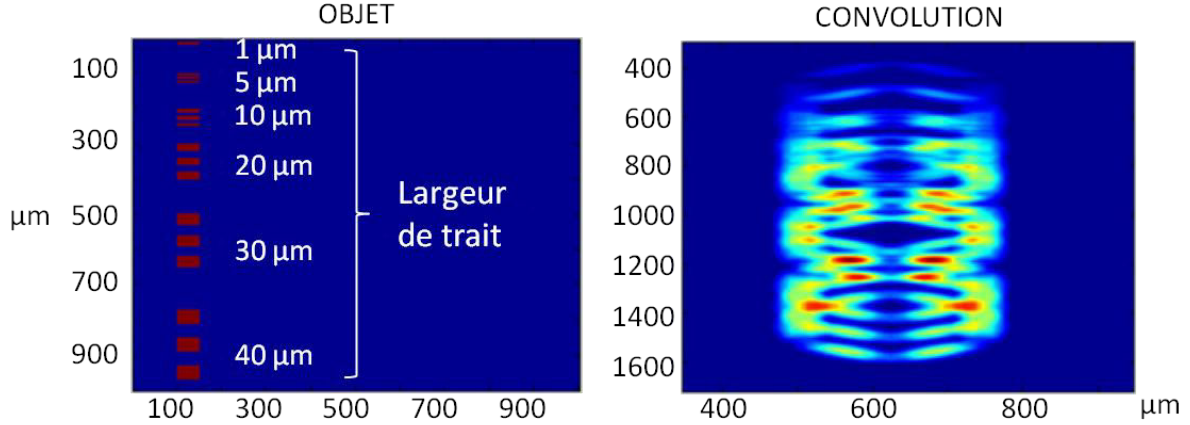


Figure 19 : à gauche : Objet simulant des traits de la mire USAF 1951 et à droite : zoom sur l'image correspondante du système imageur

Cette image résulte du fait que l'on convolue l'objet avec une lucarne d'entrée de forme quasi-annulaire, ce qui induit un dédoublement de l'image des traits. Le modèle permet ensuite d'afficher les transformées de Fourier de l'objet et de l'image permettant d'en déduire la fonction de transfert  $FT$ , la réponse impulsionnelle  $RI$  et la résolution spatiale du système dans la direction  $y$  (Figure 20) avec les relations suivantes (valables pour les systèmes linéaires invariants) :

$$FT = \frac{TF(image)}{TF(objet)} \quad (15)$$

$$RI = TF^{-1}(FT) \quad (16)$$

Avec  $FT$  la fonction de transfert,  $TF$  la transformée de Fourier et  $RI$  la réponse impulsionnelle. La résolution spatiale est égale à la largeur à mi-hauteur de la réponse impulsionnelle [46].



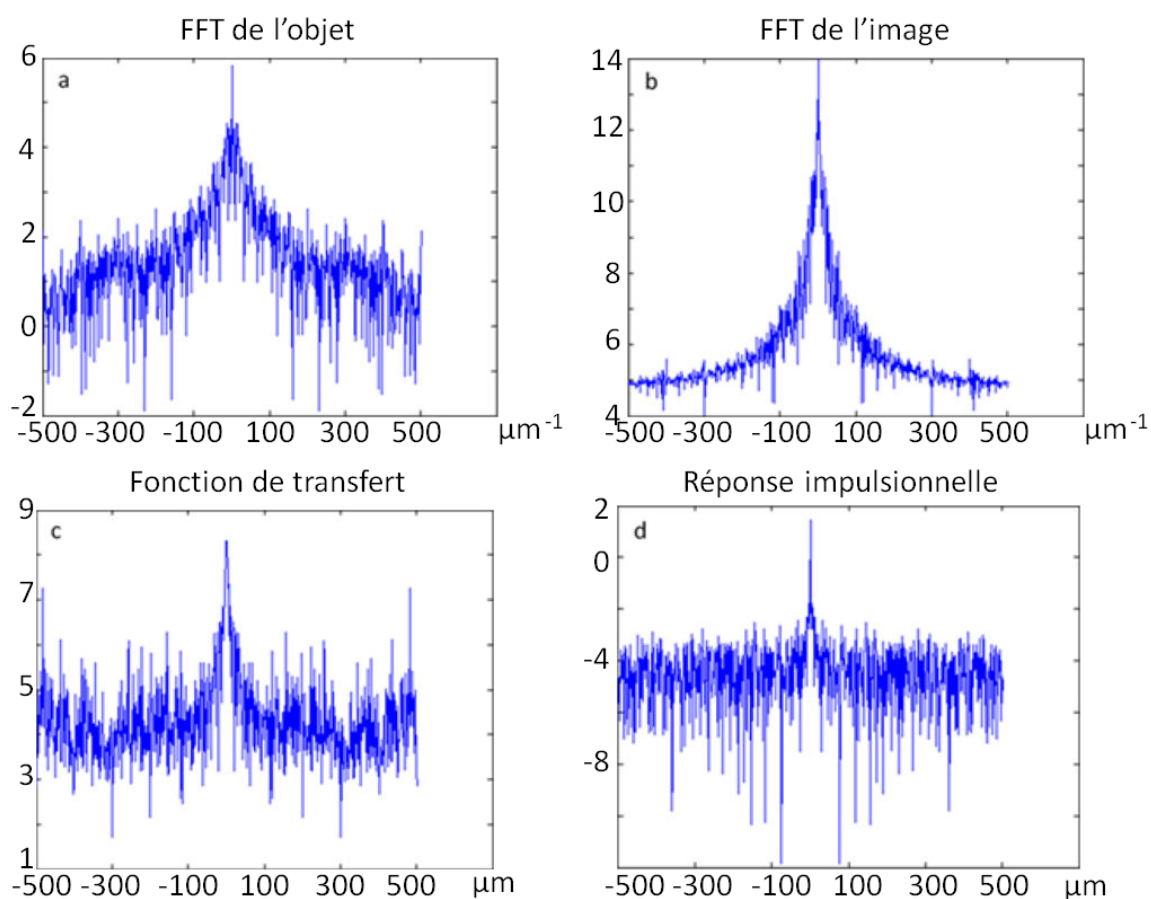


Figure 20 : (a) Transformée de Fourier de l'objet, (b) Transformée de Fourier de l'image, (c) Fonction de transfert, (d) Réponse impulsionnelle

La faible largeur de la fente du spectromètre n'autorise dans la majeure partie des cas que de collecter la lumière d'une seule fibre collectrice. Une simulation est réalisée en prenant en compte une seule fibre collectrice (Figure 21). La zone imagée sur l'échantillon n'est pas circulaire mais en forme « d'œil de chat », ce qui conduit à une résolution spatiale différente sur les deux axes, phénomènes observés dans les résultats expérimentaux (Figure 15).



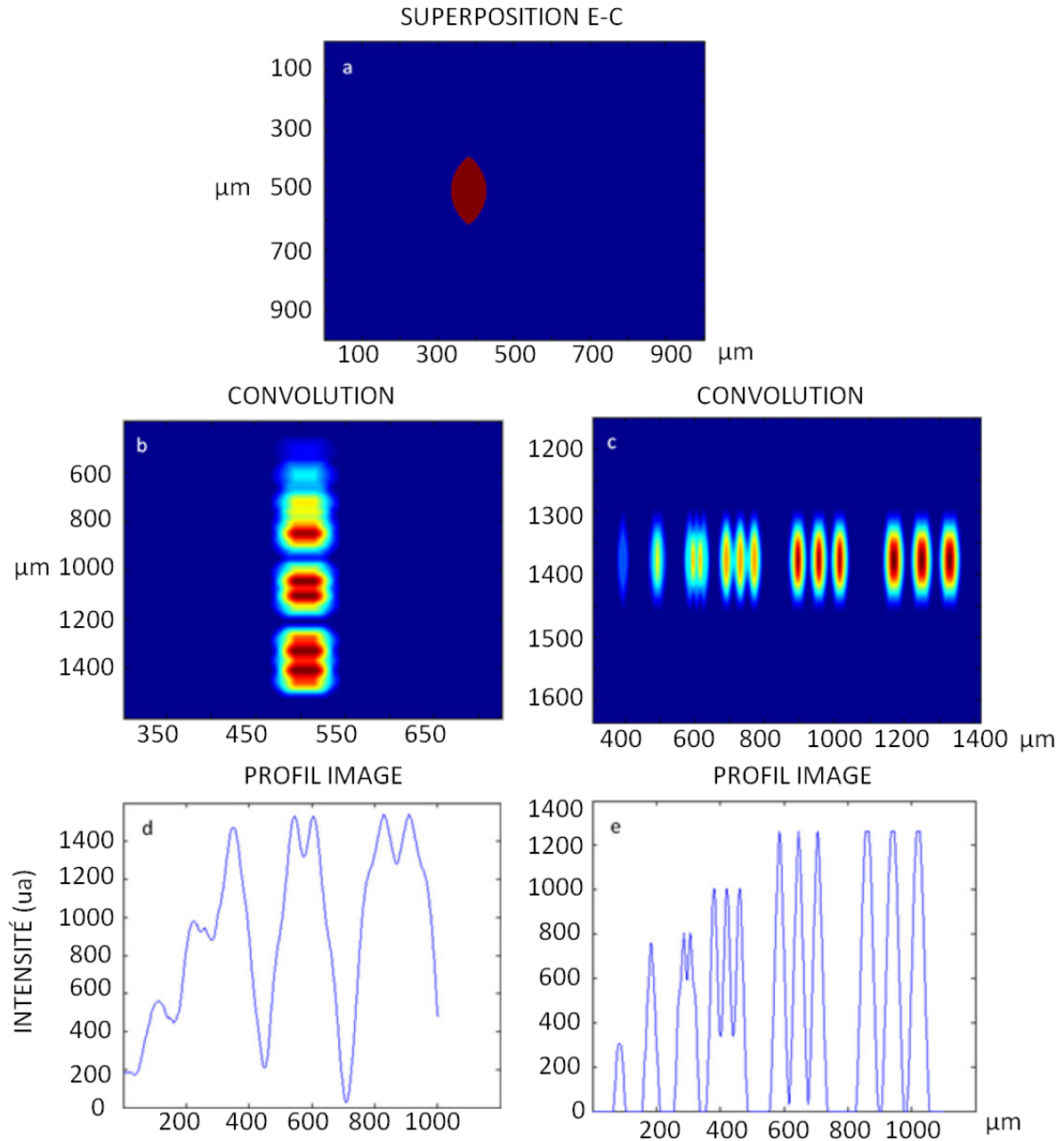


Figure 21 : (a) Superposition de la zone émettrice et d'une zone collectrice, (b) zoom sur l'image de l'objet, (c) zoom sur l'image de l'objet tournée de 90°, (d) Profil de l'image b, (e) Profil de l'image c

Les profils de la Figure 21 montrent que dans une direction (celle correspondant à la longueur de « l'œil de chat »), les traits de largeurs 40  $\mu\text{m}$  ne sont pas résolus alors que dans l'autre direction (celle correspondant à la largeur de « l'œil de chat ») les traits d'une largeur de 20  $\mu\text{m}$  sont résolus. La Figure 22 montre le même phénomène avec une autre fibre collectrice donnant des images différentes. La position du bundle est un réglage critique car elle influe directement sur la résolution dans les deux directions de l'image.

Dans ces configurations, bien que le diamètre des fibres soit de 200  $\mu\text{m}$ , le système peut résoudre des traits de largeur 20  $\mu\text{m}$ .

D'après l'étude de la réponse impulsionnelle théorique, la résolution atteinte dans le pire des

cas (Figure 21b) est de 50  $\mu\text{m}$ .

Cependant dans ce modèle, l'énergie lumineuse collectée n'est pas prise en compte. Il se peut donc que dans les cas où la largeur des traits est de 20  $\mu\text{m}$ , l'énergie lumineuse collectée soit trop faible.

De plus, dans le cas de la Figure 22, de la distorsion apparaît fortement. En effet, suivant l'orientation de la lucarne d'entrée, la forme de l'image des traits diffère. Ce type de lucarne d'entrée induit une anamorphose dans l'image.

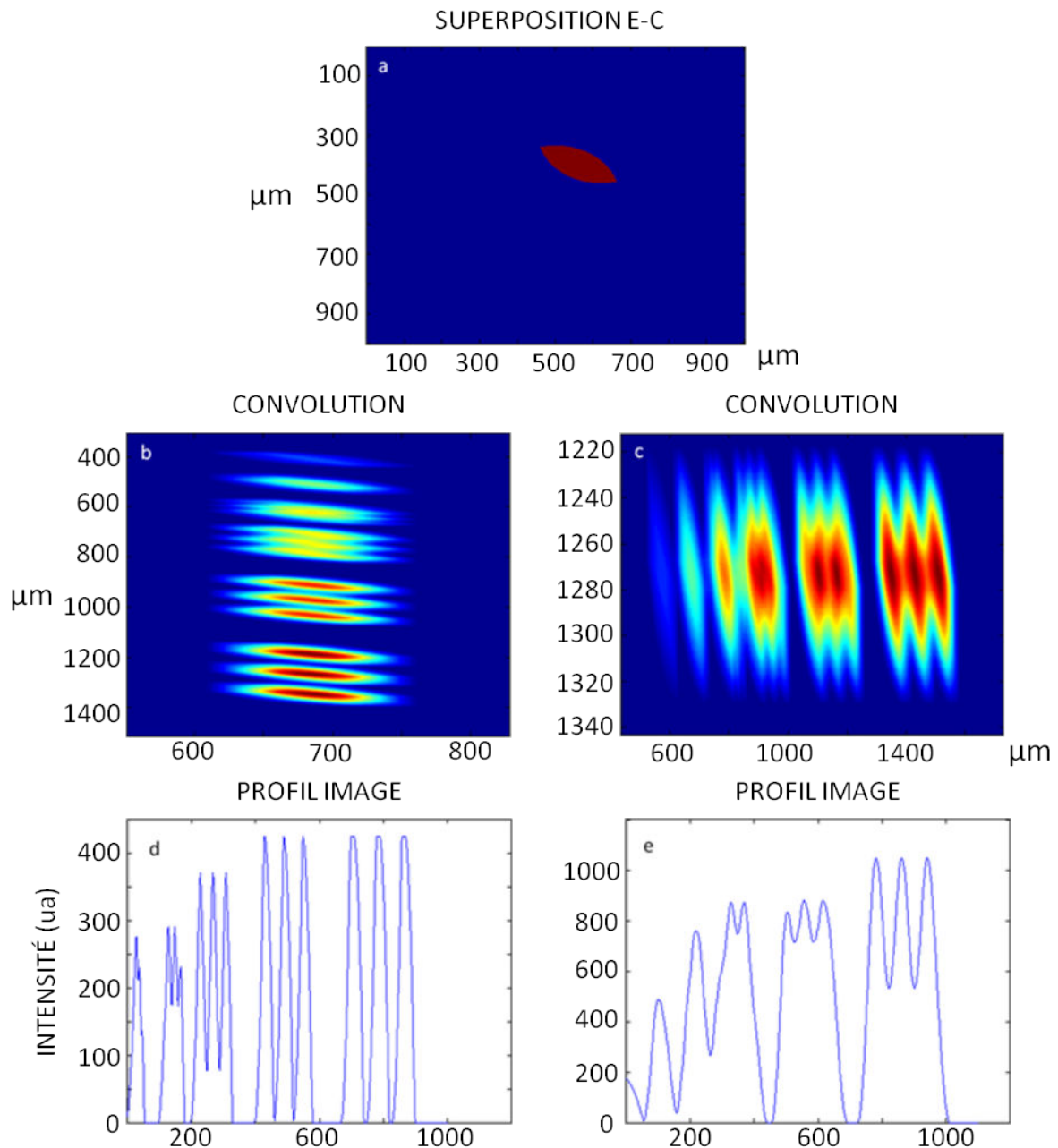
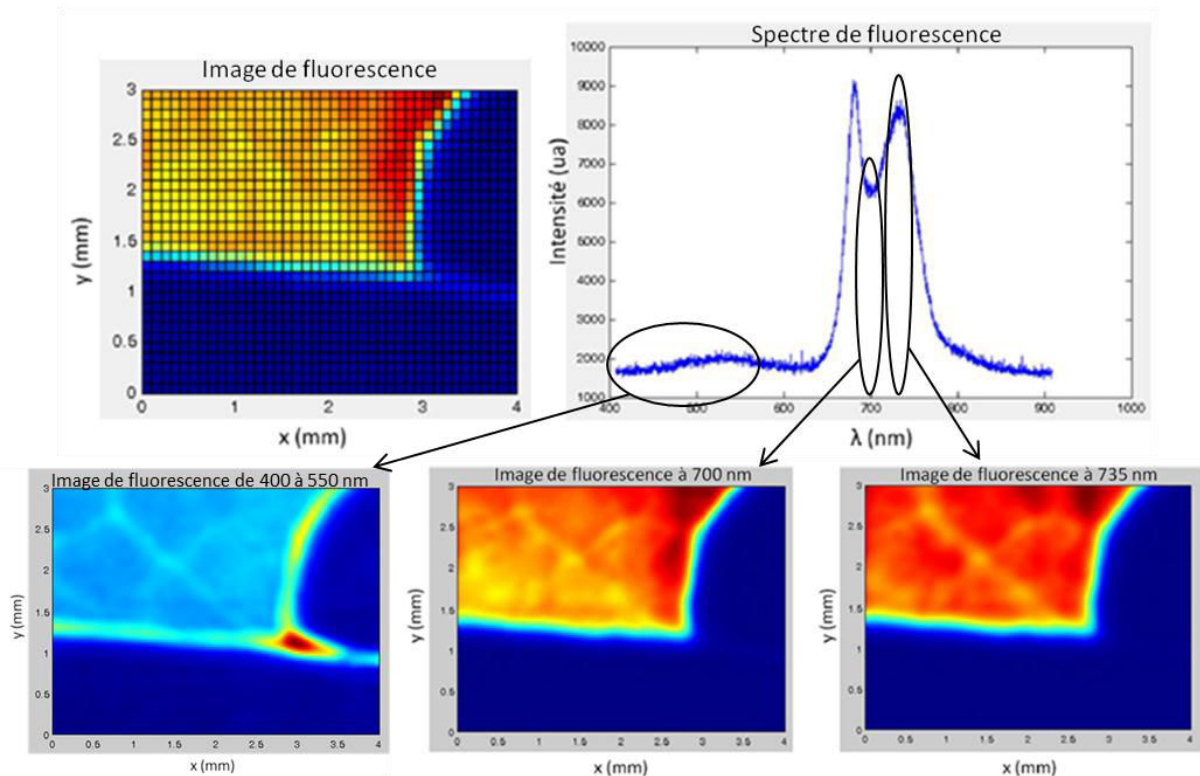


Figure 22 : (a) Superposition de la zone émettrice et d'une zone collectrice, (b) zoom sur l'image de l'objet, (c) zoom sur l'image de l'objet tournée à 90°, (d) Profil de l'image b, (e) Profil de l'image c

## 2.4. Imagerie hyperspectrale

Une image hyperspectrale peut être définie comme étant une image 3D ( $X, Y, \lambda$ ) où chaque pixel qui la compose possède un spectre d'émission de fluorescence ou de réflexion diffuse avec une résolution spectrale de l'ordre du nanomètre. La Figure 23 montre une image hyperspectrale de fluorescence en fausses couleurs d'une partie de feuille de houx (excitation à 405 nm). Comme une image de fluorescence plus conventionnelle (image 2D) obtenue en microscopie par exemple, l'intensité de chaque point est l'intégrale du spectre d'émission de fluorescence (ici, la chlorophylle). Cependant, plusieurs images peuvent être extraites de l'image hyperspectrale aux longueurs d'onde d'intérêts. Dans la Figure 23, trois images sont extraites (de 400 à 550 nm ; à 700 nm et à 735 nm).



*Figure 23 : Image hyperspectrale de fluorescence d'une feuille de houx (en haut à gauche) ; un spectre d'émission de fluorescence en un point (en haut à droite) ; trois images aux longueurs d'onde d'intérêt (en bas)*

Si l'analyse des données se fait seulement sur l'image 2D, il en est déduit que dans les zones colorées en rouge, la concentration de chlorophylle est plus importante que dans les zones colorées en jaune. Or, comme il est démontré par la suite, cette interprétation sur l'image 2D est fautive.

En effet, comme le montre la Figure 24, le spectre de fluorescence de la chlorophylle diffère en fonction de sa concentration [47]. Avec une faible concentration, le pic principal d'émission se situe autour de 670 nm. En forte concentration, le spectre se compose de deux pics autour de 680 nm et 735 nm. Ce décalage en longueur d'onde est dû à la réabsorption de la fluorescence par la molécule de chlorophylle.

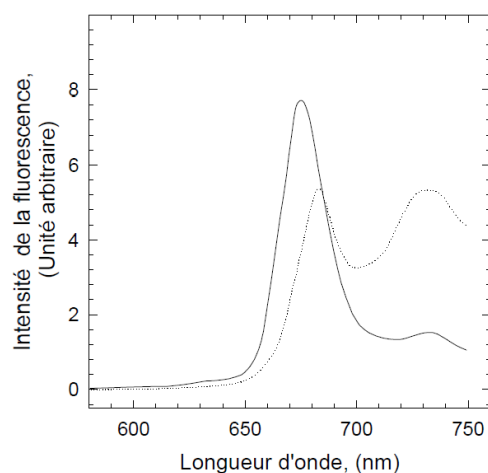


Figure 24 : Spectre de fluorescence de feuilles dont la teneur en chlorophylle est faible (trait plein) et élevée (trait en pointillés) [47].

Pour déterminer les variations de concentration de chlorophylle dans une feuille, il est nécessaire d'étudier la variation d'intensité de fluorescence à différents points du spectre. Gitelson *et al.* ont démontré que le rapport des intensités de fluorescence entre le pic à 735 nm et le creux à 700 nm est proportionnel à la concentration en chlorophylle [48].

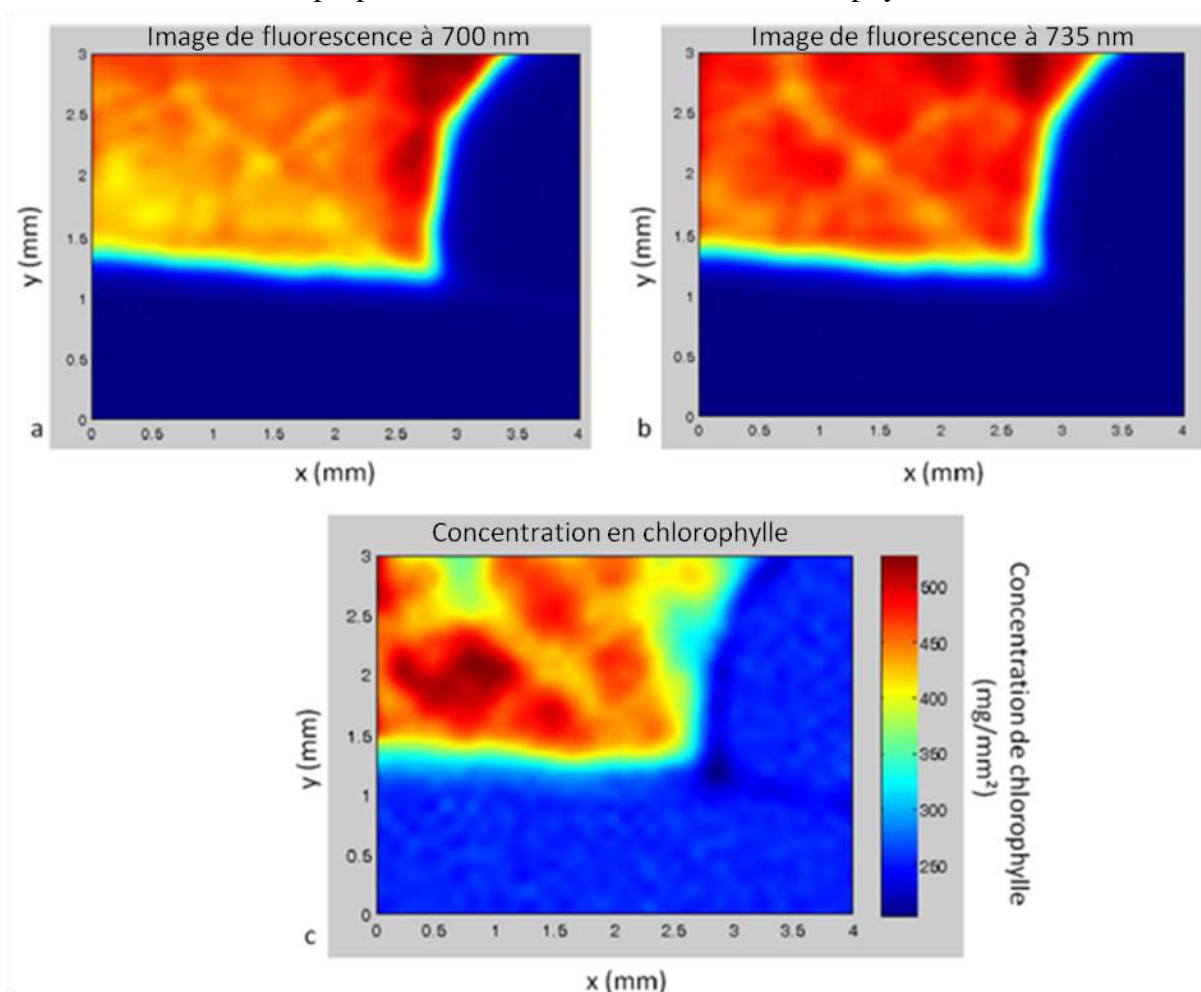
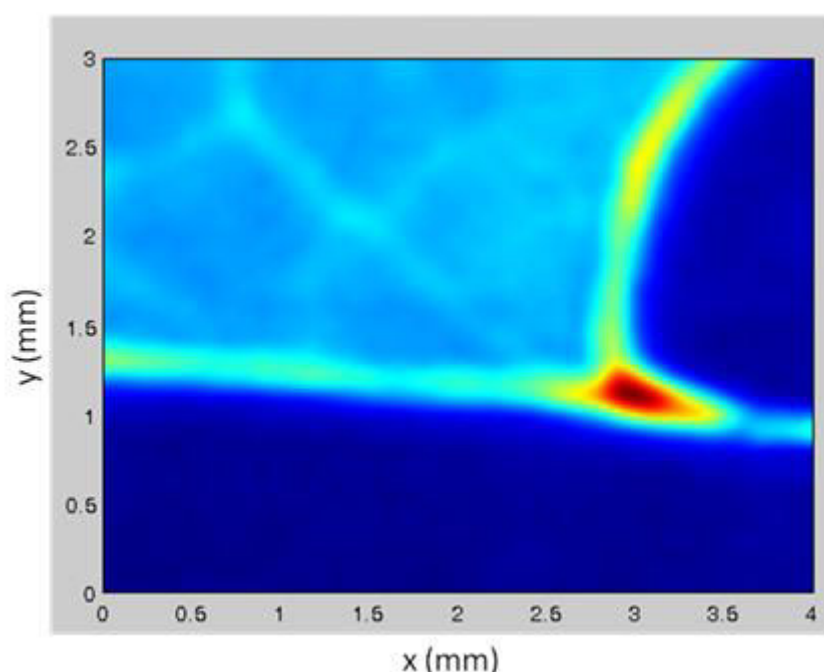


Figure 25 : Image de fluorescence (a) autour de 700 nm, (b) autour de 735 nm et (c) le rapport entre les deux images (a) et (b) représentant la variation de concentration de chlorophylle.

La Figure 25 présente deux images extraites de l'image hyperspectrale. L'image (a) représente l'intensité de fluorescence autour de 700 nm, l'image (b) l'intensité de fluorescence autour de 735 nm et l'image (c) le rapport des deux précédentes avec l'estimation de la concentration.

Les informations apportées entre l'analyse hyperspectrale et l'analyse sur l'image 2D sont différentes et complémentaires. Dans certains cas, il est donc indispensable de travailler à partir d'une image hyperspectrale.

De plus, dans le cas de la feuille, l'analyse hyperspectrale permet de montrer une autre zone de fluorescence en isolant le spectre d'émission entre 400 et 550 nm, zone invisible en imagerie classique car l'intensité de fluorescence détectée est très inférieure à celle émettant entre 650 et 800 nm (Figure 26). Cependant si seule la chlorophylle fluoresce dans le rouge et proche infrarouge, plusieurs fluorophores comme les acides féruliques, les chromones, les stilbènes, les flavines [49] et le NAD(P)H [50] peuvent être la cause de la fluorescence bleu-verte.



*Figure 26 : Image de fluorescence de la feuille entre 400 nm et 550 nm*

Cet exemple montre que l'imagerie hyperspectrale permet une analyse plus approfondie des spectres de fluorescence et est parfois indispensable pour une juste détermination de la répartition des fluorophores dans l'échantillon. En effet, l'emploi d'un microscope à fluorescence (souvent utilisé par les biologistes) ne serait pas adapté car il peut réaliser une image dite multispectrale, c'est-à-dire qu'elle est composée de plusieurs images (souvent trois) correspondante chacune à une large bande spectrale. De plus ces systèmes nécessitent la mise en place de filtres et miroirs dichroïques qui nécessite de connaître à l'avance la nature des fluorophores présents dans l'échantillon étudié [51]. En comparaison, notre système permet de sélectionner un nombre de bande spectrale d'une certaine largeur avec plus de souplesse.

Il est tout à fait envisageable d'avoir la même approche sur les tissus biologiques comme le



montre Georgakoudi *et al.* en étudiant le rapport entre la fluorescence du NAD(P)H et celle du collagène [52].

## 2.5. Imagerie multimodale

L'imagerie multimodale consiste à coupler différentes techniques d'imagerie et de mettre en correspondance les données acquises. Pour montrer l'intérêt de l'imagerie multimodale, des images hyperspectrales de fluorescence multi-excitations de cordes vocales paraffinées ont été réalisées (Figure 27).

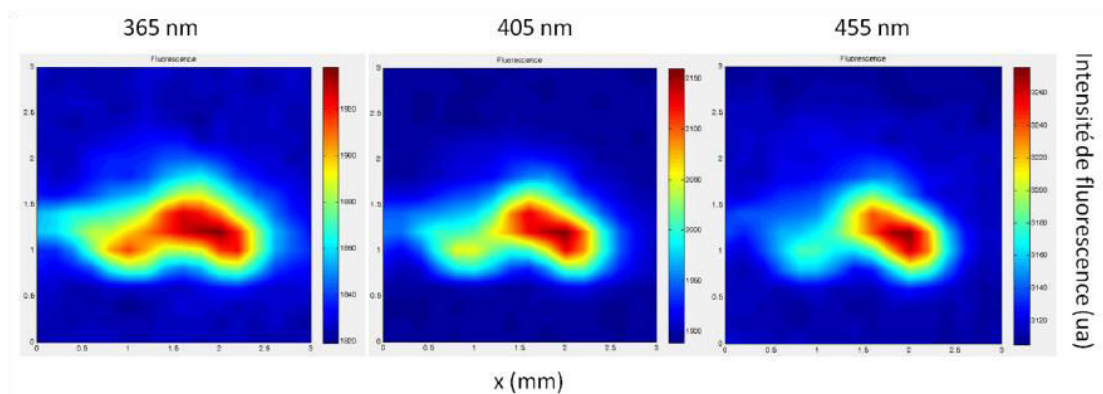


Figure 27 : Images de fluorescence d'un échantillon de corde vocale paraffiné à différentes longueurs d'onde d'excitation

Les spectres de fluorescence correspondants sont présentés dans la Figure 28.

L'interprétation de ces spectres n'est pas évidente et comme dans le cas de la fluorescence de la chlorophylle dans les feuilles, il est nécessaire d'avoir connaissance de différents phénomènes comme la réabsorption de la fluorescence par la même ou une autre molécule.

Les spectres de fluorescence de la corde vocale à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm peuvent signifier la présence de collagène, d'élastine et/ou du NADH.

La corde vocale étant un tissu de type élastique, le premier pic de fluorescence semble correspondre à l'élastine (avec une concentration 2 fois supérieure à celle du collagène dans la zone de Reinke) [53].

Le deuxième pic de fluorescence semble correspondre au NADH présent dans le métabolisme des cellules.

La forme globale du spectre laisse penser qu'une partie de la fluorescence est absorbée autour de 450 nm. Cette longueur d'onde correspond à l'absorption des flavines (Figure 6). Les deux spectres de fluorescence à 365 nm montrent que le 2<sup>ème</sup> pic est plus ou moins présent. L'hypothèse est que la faible intensité de ce 2<sup>ème</sup> pic correspond à une augmentation en concentration de flavines.

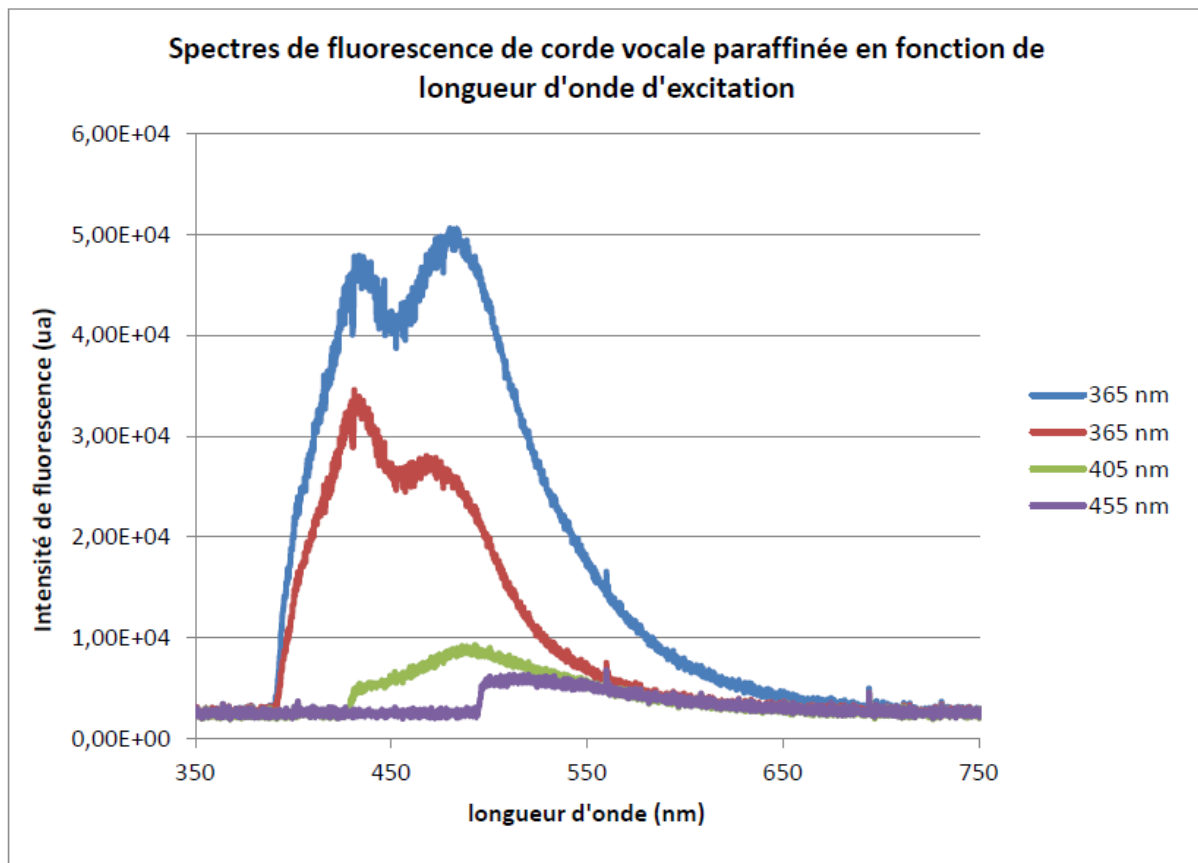


Figure 28 : Spectres d'émission de fluorescence d'un échantillon de corde vocale paraffiné à temps d'intégration égaux (les deux courbes à 365 nm correspondent à deux points différents de l'échantillon)

Pour étudier l'influence des flavines, plusieurs images sont réalisées à partir des mesures de spectre de fluorescence. La Figure 29 présente deux images issues de l'image de fluorescence hyperspectrale à 365 nm. La première à 480 nm montre les variations d'intensité du 2<sup>ème</sup> pic dans l'échantillon et la deuxième image montre les variations d'intensité du creux à 450 nm. La troisième image de la Figure 29 représente le rapport d'intensité entre ces deux images. Elle permet de visualiser les zones de l'échantillon où le 2<sup>ème</sup> pic est présent. Pour comparer ce résultat à la présence de flavines, une image en réflexion (deuxième modalité) à 455 nm est réalisée (Figure 30). Une faible intensité de réflexion correspond à une forte absorption à 455 nm et par conséquent à une présence importante de flavines. La deuxième image de la Figure 30 montre le rapport d'intensité du 2<sup>ème</sup> pic à l'intensité de réflexion à 455 nm. Si la variation d'intensité du 2<sup>ème</sup> pic est liée à la variation de concentration de flavines alors le rapport entre l'intensité de ce pic à l'intensité de réflexion à 455 nm est proche de 1. Expérimentalement, le rapport est de 94 % à 100 %. Si ceci reste une première interprétation, les variations d'intensité de fluorescence semblent être liées à une variation de la concentration en flavines dans le tissu.

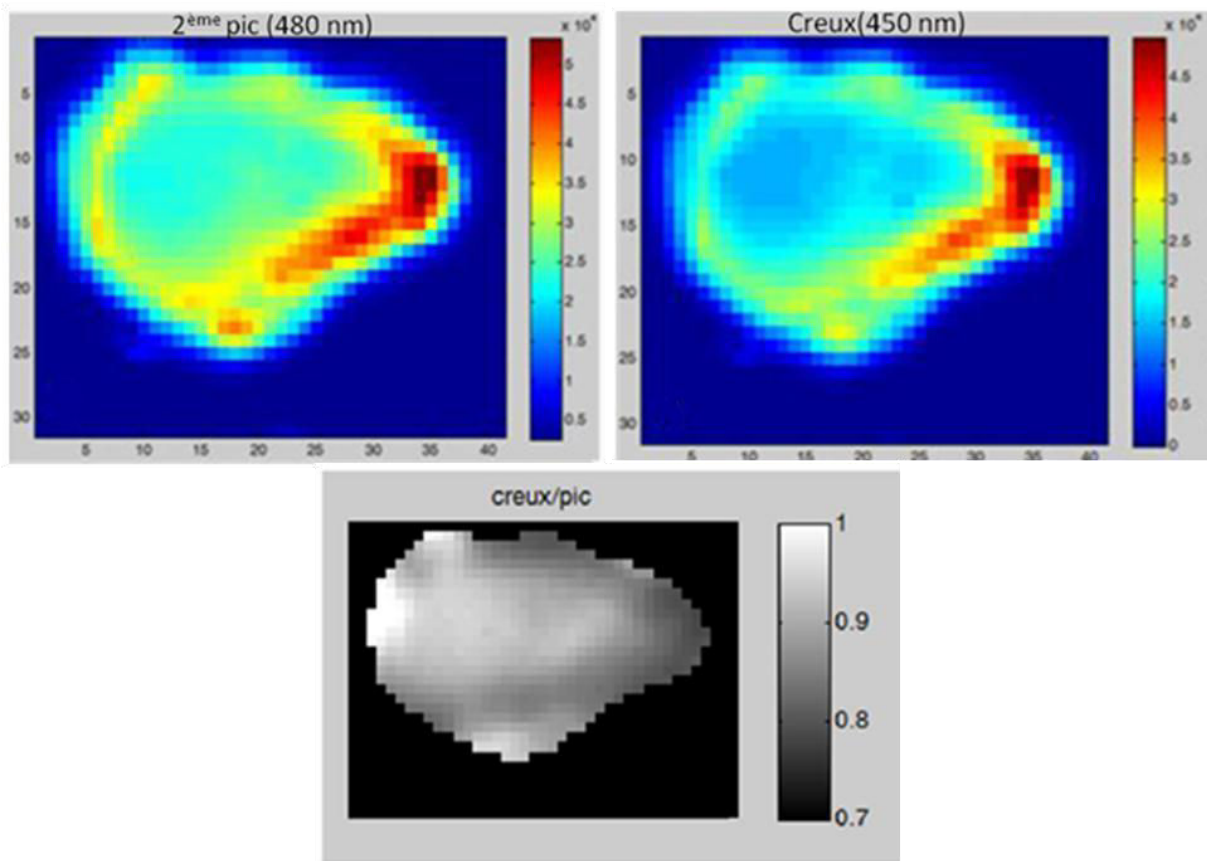


Figure 29 : Image de fluorescence de corde vocale à une excitation à 365 nm, 2<sup>ème</sup> pic de fluorescence (en haut à gauche), creux à 450 nm (en haut à droite), Rapport d'intensité creux/pic (en bas)

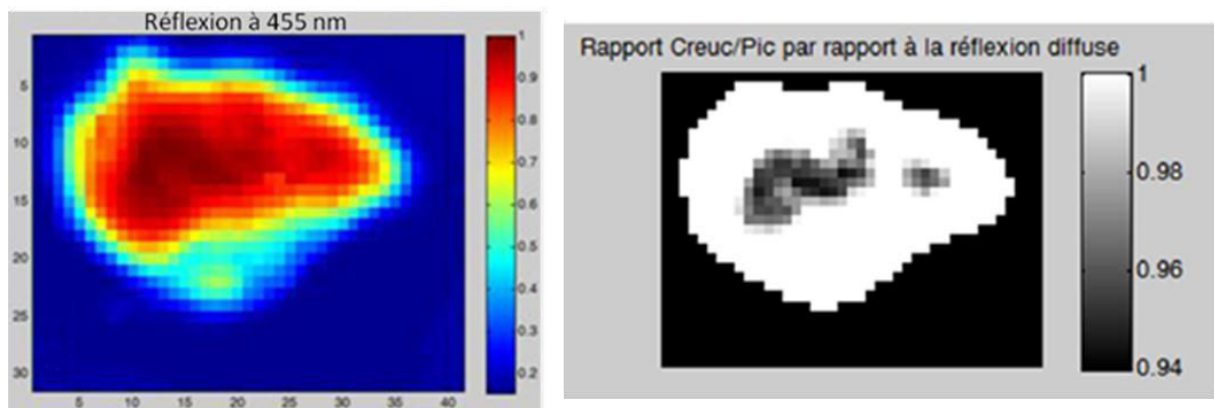


Figure 30 : Image de réflexion à 455 nm (à gauche), Correspondance entre le rapport creux/pic et la réflexion à 455 nm

Bien que l'interprétation des données reste peu évidente, notre système d'imagerie hyperspectrale permet de réaliser des mesures de fluorescence et de réflexion à plusieurs longueurs d'onde d'excitation. Le couplage entre les deux modalités et l'analyse hyperspectrale permet de noter la présence ou non de certains fluorophores et leur variation en concentration dans un échantillon.



### 3. Conclusion

Un système fibré d'imagerie hyperspectrale a été réalisé avec trois sources d'excitation (365 nm, 405 nm et 455 nm) pour la mesure de fluorescence multi-excitation. C'est un système multimodal qui permet d'étudier la réflexion avec ces mêmes sources lumineuses et une source halogène pour la mesure de réflexion en lumière blanche. Un commutateur à fibre optique pilotable par ordinateur permet de changer de sources sans toucher au système.

Le principal problème est la perte de puissance lumineuse au niveau des porte-filtres et du commutateur à fibres. En effet, ces systèmes optiques sont optimisés pour des fibres de diamètre de cœur de 200  $\mu\text{m}$  et une ouverture numérique de 0,22.

Pour améliorer le système, il faudrait obtenir des porte-filtres adaptées à des fibres avec des cœurs plus gros (600  $\mu\text{m}$ ) et une plus grande ouverture numérique (0,39) en utilisant des lentilles de diamètre plus grand et une distance focale plus petite.

Afin d'avoir une intensité de fluorescence plus importante, il serait intéressant d'avoir des sources fibrées similaires avec des puissances lumineuses plus importantes.

Cependant, l'exemple sur les feuilles de houx montre que l'imagerie hyperspectrale est essentielle pour l'étude de la concentration de la chlorophylle. Dans les tissus biologiques, de nombreux fluorophores sont présents. Si l'analyse hyperspectrale permet de distinguer les principaux chromophores, il reste difficile d'étudier les proportions de chacun. Pour cela, il est nécessaire de connaître la nature du tissu (peau, colon, cordes vocales etc...) et de connaître la structure et la composition de ces tissus à l'état sain.

Le caractère multimodal de notre système peut être une réponse face à la difficulté d'identification des fluorophores. En effet, l'ajout de la mesure en réflexion, permet d'apporter une information supplémentaire et complémentaire permettant d'identifier certains fluorophores comme les flavines, exemple présenté précédemment.

La troisième partie de ce mémoire présente les travaux réalisés en imagerie OCT. Cette technique, fondée sur l'analyse des échos optiques produits par le phénomène de réflexion à chaque variation d'indice entre les différentes couches du tissu biologique, permet de remonter à la structure des tissus. Elle s'avère donc être une technique complémentaire de la fluorescence.

### III. Données structurelles : Tomographie optique cohérente

#### 1. Introduction

La tomographie optique cohérente ou OCT (pour Optical Coherence Tomography) est une technique d'imagerie suscitant un intérêt grandissant de la part des chercheurs et du monde médical depuis une vingtaine d'années et spécialement dans le domaine du biomédical. Elle permet de réaliser des images tridimensionnelles de la structure interne des tissus biologiques de manière non-invasive avec une haute résolution transverse (1-15  $\mu\text{m}$ ). En termes de résolution et de profondeur d'image, l'OCT se situe entre l'échographie et la microscopie confocale (Figure 31), ce qui lui a permis d'avoir un franc succès dans le domaine de l'ophtalmologie et notamment pour le diagnostic des pathologies de l'œil.

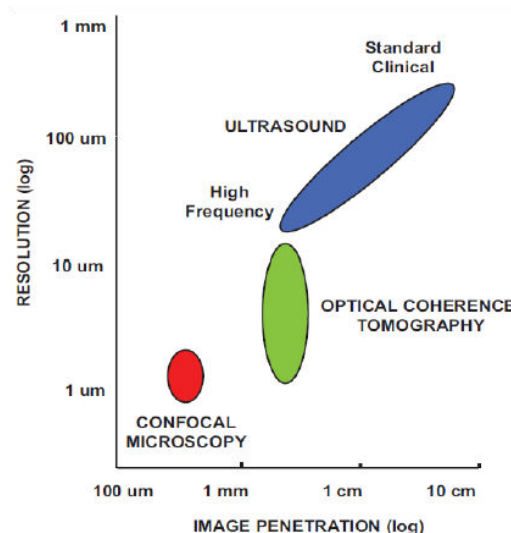


Figure 31 : Comparatif en résolution et profondeur de pénétration dans le milieu biologique entre OCT, Ultrason et Microscopie confocale [54]

Carl Zeiss Meditec est la première société à commercialiser des systèmes OCT pour l'ophtalmologie en 1996. Aujourd'hui, de nombreuses recherches sont menées à travers le monde pour rendre les systèmes plus performants en termes de sensibilité, de résolution et de vitesse d'acquisition pour des applications médicales comme l'ophtalmologie, la dermatologie et la gastro-entérologie [54] par exemple mais aussi dans le domaine artistique comme l'analyse des couches de peinture dans un tableau [55].

Pour présenter l'OCT, il est intéressant de la comparer à une technique plus ancienne et mieux connue qui est l'échographie ultrasonore [56]. C'est une technique d'imagerie qui utilise les ultrasons de fréquence allant généralement de 1 MHz à 40 MHz.

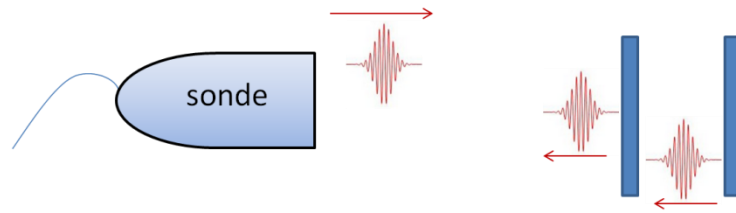


Figure 32 : Principe de l'échographie. Emetteur et récepteur sont intégrés dans la sonde.

Une sonde permettant l'émission et la réception d'ultrasons envoie une impulsion ultrasonore vers l'échantillon (Figure 32). A chaque fois qu'elle rencontre une interface, un écho est généré et enregistré par le récepteur. La résolution s'étend typiquement de 0,1 mm à 1 mm. Ces fréquences acoustiques utilisées (1 MHz – 40 MHz) sont peu absorbées par les tissus biologiques ce qui permet d'imager en profondeur. Par exemple le coefficient d'absorption de la graisse est de 0,5 dB/cm/MHz. C'est-à-dire qu'avec une onde de fréquence 1 MHz (résolution de 1 mm) et d'après la loi de Beer-Lambert, on peut analyser une épaisseur de 4,6 cm (épaisseur pour laquelle il reste 10 % de la puissance initiale). Des résolutions de 15-20  $\mu\text{m}$  ont été atteintes avec des fréquences de 100 MHz mais la profondeur de pénétration n'est plus que de quelques millimètres.

Le principe de l'OCT est relativement proche. Les ondes sonores sont remplacées par des ondes optiques. Les deux grandes différences entre ces deux ondes sont leur fréquence et leur célérité. La fréquence de la lumière est de l'ordre de  $10^8$  MHz ce qui signifie que la longueur d'onde est beaucoup plus courte que celle des ultrasons (de 380 nm à 780 nm pour le visible). La résolution en OCT est donc meilleure qu'en échographie car elle est directement liée à cette longueur d'onde. En effet, une structure plus petite que la longueur d'onde ne peut être imagée car elle interagit peu avec l'onde (Figure 33).

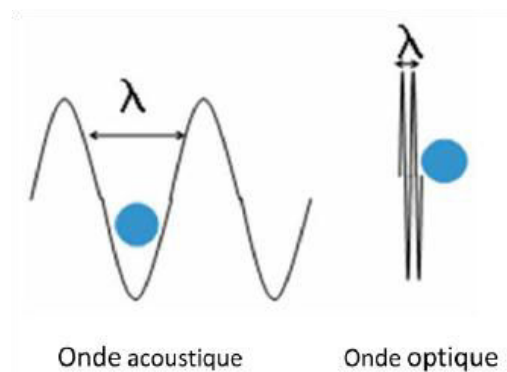


Figure 33 : illustration de la différence de longueur d'onde vis à vis d'une particule [57]

Par contre, ces hautes fréquences sont plus absorbées, en partie parce qu'elles sont plus grandes que les ondes sonores mais surtout parce que l'énergie correspondante est proche de celles des niveaux d'énergie des molécules dans les tissus (voir Partie I).

Le libre parcours moyen de diffusion  $l_s$  dans un tissu biologique, correspondant à la distance moyenne entre deux événements de diffusion dans le visible et l'infrarouge, est d'environ 50  $\mu\text{m}$  (voir Tableau 3). La profondeur maximale  $z$  (pour laquelle il reste un seul photon) que l'on peut imager est de :

$$z = \frac{l_s}{2} \ln \left( \frac{E_{ph}}{P \cdot \Delta t} \right) \quad (17)$$

Avec  $l_s$  le libre parcours moyen,  $E_{ph}$  l'énergie d'un photon,  $P$  la puissance moyenne envoyée sur l'échantillon et  $\Delta t$  la durée de l'impulsion laser. Le facteur 2 représente l'aller-retour des photons dans l'échantillon.

Cela signifie que si on éclaire le tissu biologique avec un laser émettant des impulsions d'une durée de 1 ns à 625 nm avec une puissance moyenne de 5 mW, la profondeur accessible est de 0,5 mm (bien inférieure à la profondeur accessible par des ondes sonores indiquée précédemment). De plus, dans les tissus biologiques, alors que la vitesse du son est d'environ 1500 m/s, la vitesse de la lumière est de  $2,14 \cdot 10^8$  m/s (avec un indice de réfraction de 1,4). Cela signifie que si deux interfaces sont distantes de 2  $\mu$ m dans un tissu, le temps entre les deux échos acoustiques sera de 3 ns et le temps entre les deux échos optiques sera de 19 fs. Dans le premier cas, l'utilisation d'un détecteur acoustique conventionnel est envisageable. Dans le second cas, cela n'est plus possible car les détecteurs les plus rapides ont une vitesse d'acquisition de 100 fs avec des caméras à balayage de fente (« streak » caméras). Les systèmes OCT sont donc plus complexes à mettre en œuvre car ils nécessitent l'utilisation de « portes temporelles optiques » pour détecter les différents échos. Les portes optiques peuvent être générées avec un interféromètre comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit.

La première partie de ce chapitre présente tout d'abord un historique des techniques OCT classées en deux catégories, dans le domaine temporel (TD-OCT) et dans le domaine spectral (FD-OCT). Ensuite, est présenté un état de l'art d'un système hybride appelé Scan-free OCT. La dernière partie traite du système développé au laboratoire, qui appartient à cette dernière catégorie, avec la description des travaux effectués pendant la thèse.

## 2. Définitions

Avant de traiter plus en détail la technique de tomographie optique cohérente, il est important d'introduire quelques définitions liées notamment aux performances de ce type de système.

- La résolution latérale (ou résolution spatiale) : comme tout système d'imagerie optique, elle correspond à la taille minimum de ce que l'on peut observer à travers le système (figure d'Airy).

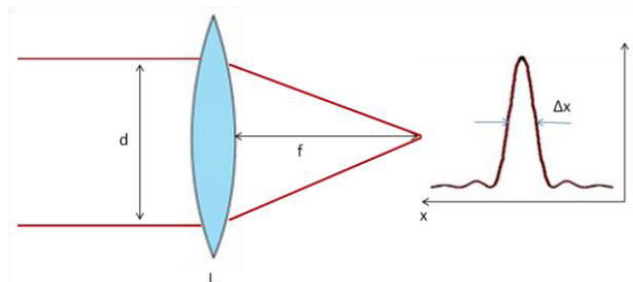


Figure 34 : Schéma de focalisation d'une lentille et sa figure d'Airy

Elle est directement liée à la source lumineuse et au système optique de focalisation qui illumine l'échantillon (Figure 34). Dans les conditions d'approximation paraxiale, la résolution  $\Delta x$  est donnée par :

$$\Delta x = \frac{\alpha \lambda f}{d} \quad (18)$$

Avec  $\alpha$  une constante dépendante de la forme du faisceau focalisé ( $\alpha = 1,27$  avec un faisceau gaussien et  $\alpha = 2,44$  pour une onde plane),  $\lambda$  la longueur d'onde centrale,  $f$  la distance focale de l'objectif ou de la lentille de focalisation et  $d$  le diamètre du faisceau sur la lentille de focalisation [58].

- La résolution axiale : c'est la résolution en profondeur (sur le plan perpendiculaire à celui de la résolution latérale).

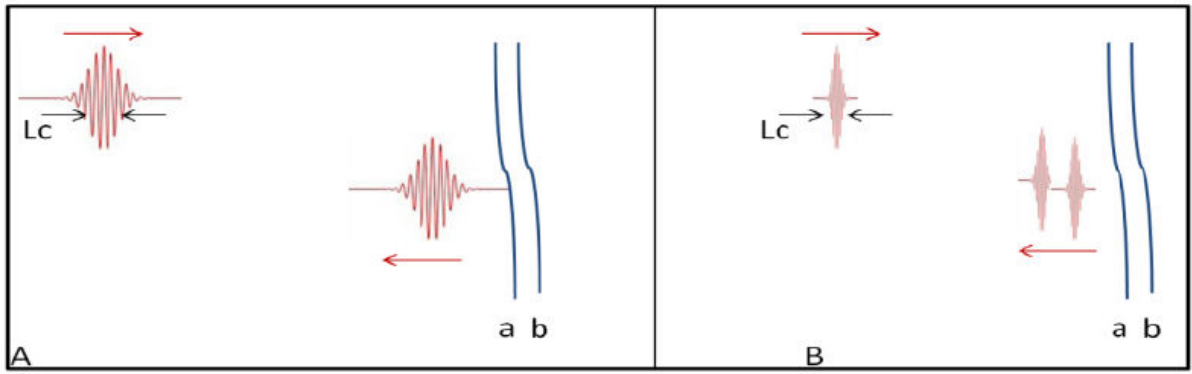


Figure 35 : Longueur de cohérence et résolution axiale. A : la longueur de cohérence est trop grande pour résoudre les interfaces a et b de l'échantillon analysé ; B : la longueur de cohérence est assez petite pour visualiser les deux interfaces a et b

Elle est déterminée par la longueur de cohérence temporelle  $l_c$  de la source lumineuse (Figure 35). Pour une source présentant un spectre gaussien (comme la plupart des sources utilisées en OCT), la résolution axiale  $\Delta z$  est, selon la référence [58], donnée par :

$$\Delta z = l_c = \frac{2 \ln 2 \cdot \lambda^2}{\pi \cdot n \cdot \Delta \lambda} \quad (19)$$

Avec  $n$  l'indice de réfraction du milieu étudié et  $\Delta \lambda$  largeur de bande optique de la source lumineuse.

La résolution axiale dépend de la largeur de bande spectrale :  $\Delta \nu = c \cdot \frac{\lambda^2}{\Delta \lambda}$  autrement dit de la cohérence temporelle de la source.

- La vitesse d'acquisition : c'est la vitesse à laquelle une image est réalisée. En OCT temporelle, il existe plusieurs types d'images suivant les applications (Figure 36).

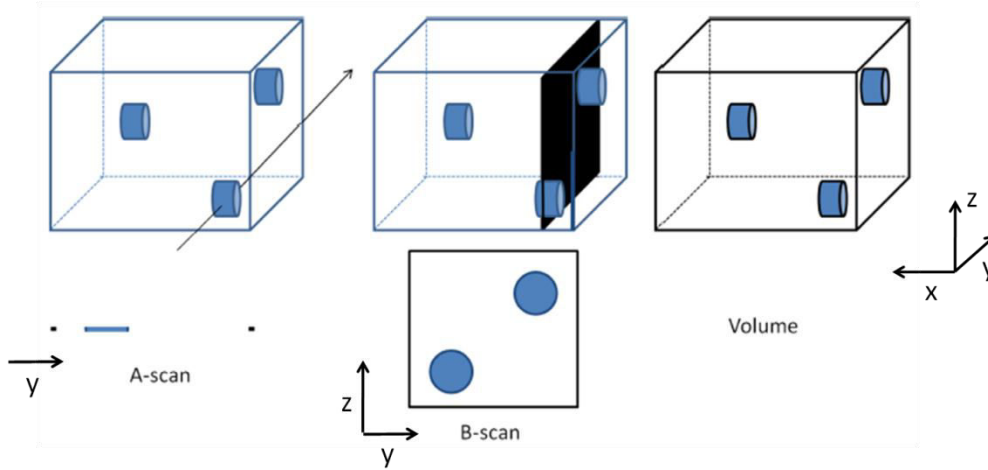


Figure 36 : Types d'image OCT

- A-scan : l'image est une ligne (1D) dans la profondeur de l'échantillon. Dans un plan XYZ, les positions x et y sont fixes, z est variable.
- B-scan : C'est une image 2D composée de plusieurs A-scans. Elle correspond à un plan dans l'échantillon. Si la position x est fixe alors les positions y et z sont variables.
- Volume : C'est une image 3D composé de plusieurs B-scan donnant une image en 3 dimensions.
- La sensibilité : en OCT, la sensibilité est définie comme étant la plus faible réflexion issue de l'échantillon que le système peut détecter. Elle est liée au rapport signal à bruit  $SNR$  minimal :

$$S = 10 \log(SNR) \quad (20)$$

Les bruits présents en OCT sont le bruit thermique, le bruit de grenaille et le bruit d'intensité relatif [59] :

$$N_{bruit} = \frac{4kT}{R} + \frac{2\eta e^2 P_{réf}}{E_v} + 2 \left( \frac{\eta e P_{réf}}{E_v} \right)^2 \cdot \tau_{coh} \quad (21)$$

Avec  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température en degré Kelvin,  $R$  la valeur de la résistance du détecteur,  $\eta$  l'efficacité quantique du détecteur,  $e$  la charge de l'électron,  $P_{réf}$  puissance du bras référence de l'interféromètre,  $E_v$  l'énergie du photon et  $\tau_{coh}$  le temps de cohérence de la source. En augmentant suffisamment la puissance dans le bras référence, le bruit thermique et le bruit d'intensité deviennent négligeables devant le bruit de grenaille. Le signal  $S_{signal}$  étant exprimé ainsi :

$$S_{signal} = \frac{2\eta^2 e^2 P_{réf} P_{échantillon}}{E_v^2} \quad (22)$$

La sensibilité  $S$  devient :

$$S = 10 \log \left( \frac{\eta P_s}{2h\nu_0 B} \right) \quad (23)$$

Avec  $\eta$  l'efficacité quantique du détecteur,  $P_s$  la puissance lumineuse arrivant sur l'échantillon,  $h$  la constante de Planck,  $\nu_0$  la fréquence moyenne de la lumière utilisée et  $B$  la largeur de bande de détection (soit l'inverse du temps d'intégration) [58].

### 3. Etat de l'art

#### 3.1. OCT dans le domaine temporel

##### 3.1.1. Origine de l'imagerie optique biologique en temps de vol

L'OCT est basée sur la réception des échos optiques pour imager l'intérieur d'un tissu. L'utilisation des échos optiques pour voir à travers les tissus biologiques a été proposée en premier par Michel Duguay il y a plus de 40 ans en 1971 [60]. Ses études présentent un obturateur optique ultra rapide sur la base d'un effet Kerr optique qui peut « photographier » la lumière. Il a notamment montré cela avec une solution d'eau et de lait.

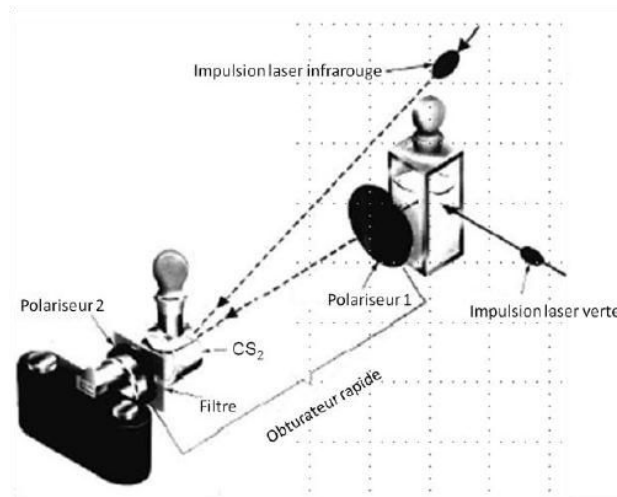


Figure 37 : Montage de l'obturateur optique [60]

L'effet Kerr optique est un effet non linéaire [61]. Dans cette expérience, une cuve remplie de sulfure de carbone CS<sub>2</sub> est placée entre deux polariseurs croisés. Une impulsion laser infrarouge polarisée de haute densité de puissance (~100 MW/cm<sup>2</sup>) traverse la cuve. Cela

entraîne une variation d'indice sur un axe du milieu. Une autre impulsion laser verte traverse la solution d'eau et de lait. Certains photons diffusent en direction de la cuve. Le premier polariseur transmet ces quelques photons. S'ils traversent la cuve en même temps que l'impulsion infrarouge alors leur polarisation tourne de 90°, en effet la variation d'indice induit une biréfringence. Ils traversent ensuite le deuxième polariseur et arrivent au détecteur (Figure 37). Le temps de relaxation du CS<sub>2</sub> étant relativement court (2 ps), l'effet Kerr optique dure le temps de l'impulsion laser (10 ps). L'ensemble devient un obturateur rapide. Duguay proposa ce système pour l'imagerie car il permet de sélectionner les photons réfléchis par les différentes couches du tissu biologique.

En 1978, Bruckner utilise cette même méthode d'obturateur optique pour étudier les particules diffusantes présentes dans le cristallin dans le cas d'une cataracte [62]. Cette expérience fait partie des premières techniques d'imagerie optique en profondeur de tissu biologique.

Inspirés des travaux présentés précédemment et de ceux concernant la technique de réflectométrie optique dans le domaine temporel présenté dans la partie suivante, Fujimoto réalise des mesures de cornée d'œil de lapin *in vivo* en utilisant des impulsions laser femtosecondes et la méthode d'intercorrrelation optique non linéaire [63].

L'utilisation d'un laser femtoseconde permet d'atteindre une meilleure résolution, celle-ci étant directement liée à la durée d'impulsion. Avec une impulsion de 65 fs, la résolution axiale est de 19,5 µm. L'intercorrrelation optique non linéaire est la superposition spatiale et temporelle d'un faisceau référence et d'un faisceau correspondant aux échos émis par l'échantillon dans un cristal non linéaire (KDP). Cela nécessite d'utiliser une source de forte puissance pour générer une nouvelle fréquence égale à la somme des fréquences des faisceaux incidents et un réglage fin pour avoir un accord de phase entre les deux ondes incidentes permettant une conversion optimale. En sortie du cristal, le signal doublé en fréquence correspondant à l'intercorrrelation des deux faisceaux incidents est de la forme :

$$S(\tau) \sim \int_{-\infty}^{+\infty} I_s(t) \cdot I_r(t - \tau) dt \quad (24)$$

$I_r$  est l'intensité du signal de référence,  $I_s$  l'intensité du signal réfléchi et  $\tau$  le retard temporel entre ces deux signaux.

L'intercorrrelation non linéaire des deux signaux donne une figure d'interférences en intensité d'un profil *in vivo* d'un œil de lapin avec une résolution spatiale d'environ 15 µm (n=1,3) et une sensibilité de 70 dB (Figure 38).



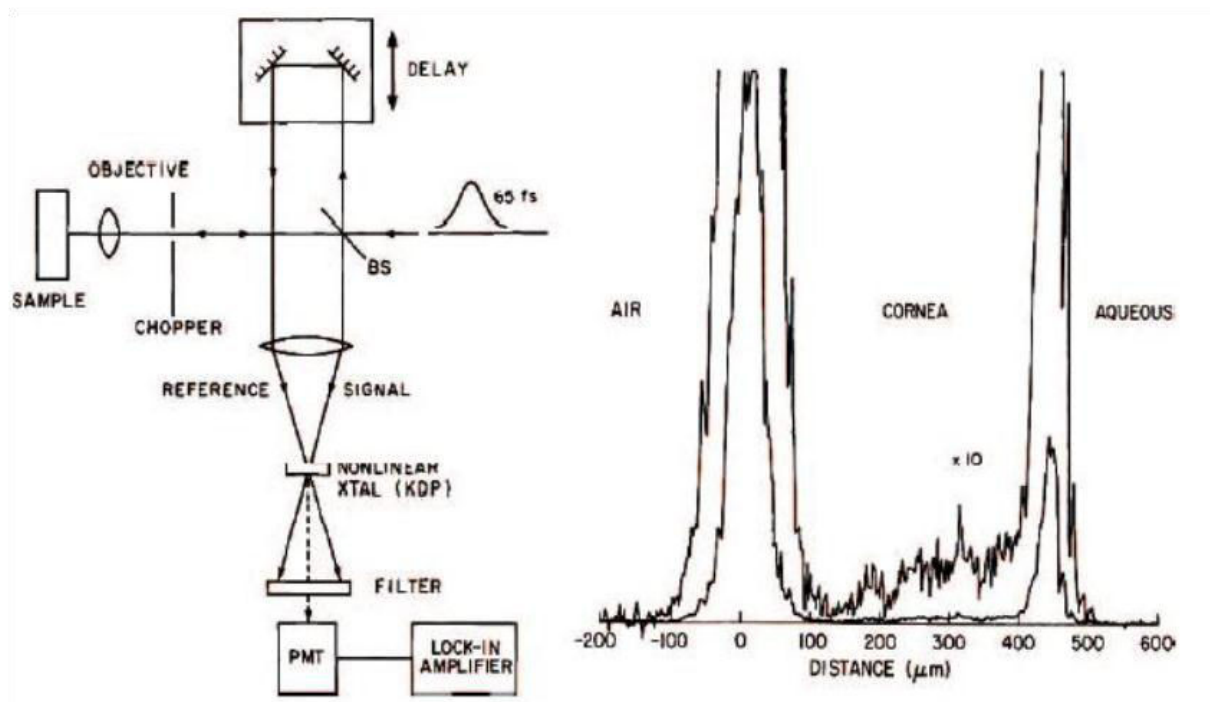


Figure 38 : à gauche : Schéma de principe, à droite : Profil d'intensité mesuré d'un œil de lapin [63]

Si l'on souhaite obtenir une résolution de  $1\text{ }\mu\text{m}$ , il faut des impulsions d'une durée de 3 fs ce qui n'est pas facilement réalisable et nécessite des sources lasers complexes. Cette technique sera abandonnée pour l'imagerie des tissus biologiques car elle nécessite l'utilisation de sources lumineuses coûteuses (car complexes) comme les lasers femtosecondes. La technique de réflectométrie optique dans le domaine temporel avec l'utilisation de source blanche à faible cohérence lui sera préférée.

### 3.1.2. Réflectométrie à faible cohérence

Les débuts de l'OCT peuvent être attribués à Flournoy qui en 1972 utilise un interféromètre de Michelson et une source de lumière blanche pour mesurer l'épaisseur d'un film plastique [64].

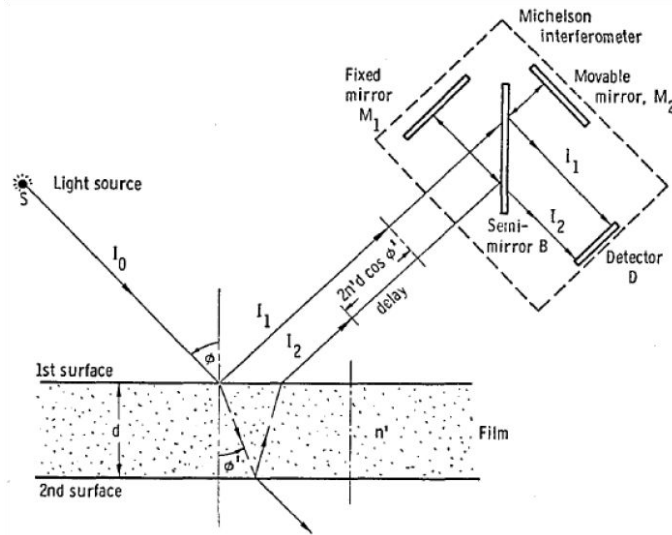


Figure 39 : Schéma de principe de mesure d'épaisseur d'un film plastique (les faisceaux  $I_1$  et  $I_2$  ont été séparés pour des raisons d'explication, ils sont en réalité confondus) [64]

Comme le montre la Figure 39, un faisceau incident arrive sur l'échantillon avec un angle  $\phi$ .  $I_1$  correspond à une réflexion de ce faisceau sur la première face et  $I_2$  correspond à la réflexion de la deuxième face. Ce deuxième faisceau est en retard par rapport au premier de  $2n'd \cos \phi'$ .  $n'$  est l'indice de réfraction du milieu traversé et  $2d \cos \phi'$  est la distance supplémentaire parcourue par le faisceau  $I_2$ . Ces deux faisceaux arrivent dans l'interféromètre qui permet leur superposition spatiale et temporelle à l'aide de miroirs et d'un cube séparateur. Cette superposition de faisceaux ayant subi des différences de trajet optique conduit à la formation d'interférences. Avec une source de largeur de bande spectrale s'étendant de  $k_1$  à  $k_2$  et de densité spectrale de puissance de profil Gaussien, l'intensité au niveau du détecteur est :

$$I(\Delta) = \int_{k_1}^{k_2} I_1(k) + I_2(k) + 2\sqrt{I_1(k)I_2(k)} \cdot \cos(k(\Delta + 2n'd \cos \phi')) dk \quad (25)$$

$\Delta$  représente la différence de distance optique entre les deux bras de l'interféromètre due au déplacement du miroir  $M_2$  et  $k$  le nombre d'onde ( $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ ).

La Figure 40 montre l'interférogramme ainsi obtenu :

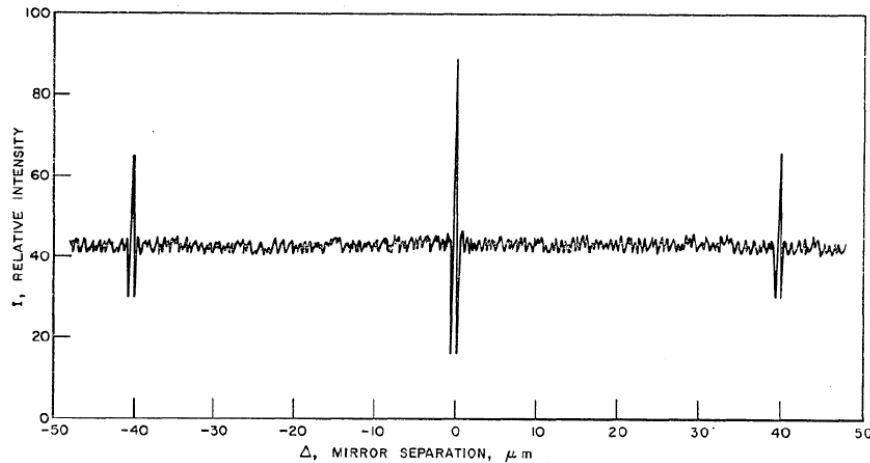


Figure 40 : Interférogramme du film plastique [64]

Cet interférogramme est obtenu en plusieurs acquisitions et chaque point enregistré correspond à une position connue du miroir  $M_2$ . Les interférences observées pour un  $\Delta = 0 \mu\text{m}$  apparaissent lorsque la différence de chemin optique introduite par l'interféromètre est nulle. Les deux autres figures d'interférences apparaissent lorsque cette différence de chemin optique compense celle créée par les deux faces du film plastique.

Cela signifie que le retard  $2n'd.\cos \theta'$  est égal à  $40 \mu\text{m}$ . Pour connaître la distance réelle entre les deux interfaces du film plastique, l'indice et l'angle de réfraction doivent être connus.

Cette technique a été appelée « Réflectométrie à faible cohérence optique », ou encore « interférométrie en lumière blanche » et est aussi utilisée par Younquist et Takada pour déterminer la position et mesurer l'amplitude des réflexions lumineuses dans les fibres optiques [65], [66].

Les premières applications sur des échantillons biologiques de l'interférométrie en lumière blanche ont été rapportées par Fercher et al. en 1988 et Hitzenberger en 1991, en mesurant *in vivo* la longueur axiale de l'œil [67], [68]. Les résultats sont très proches de mesures similaires réalisées par échographie. Dans le même temps, plusieurs équipes de recherche développent différentes configurations. Clivaz *et al.* réalise en 1992 le premier système d'interférométrie à faible cohérence optique fibré [69].

En 1991, La première image 2D d'un échantillon biologique est réalisée [70]. La réflectométrie à faible cohérence optique laisse place à la tomographie optique cohérente.

### 3.1.3. De la réflectométrie à la tomographie optique cohérente

L'interférométrie à faible cohérence est devenue la tomographie optique cohérente (OCT) lorsque les mesures faites sur l'œil sont passées d'un profil d'intensité à une image à deux dimensions. C'est Huang, en 1991, qui réalise la première image OCT d'un œil de bovin (Figure 41), *ex vivo* avec une résolution axiale de  $15 \mu\text{m}$  et une sensibilité maximale de 90 dB.

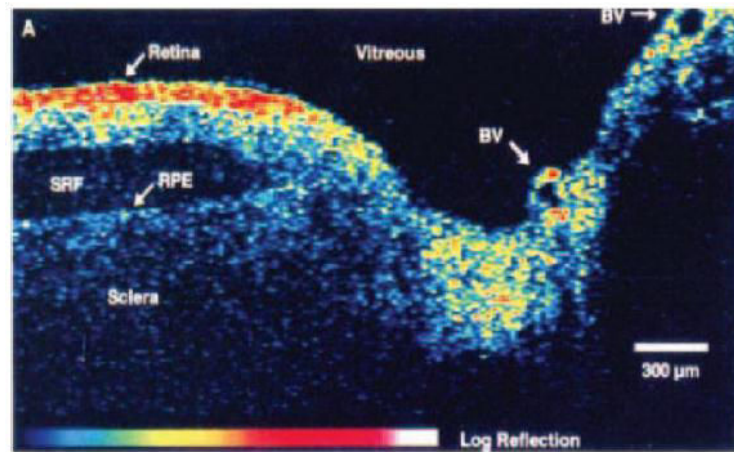


Figure 41 : Tomographe d'un œil de bovin, SRF : fluide sous-rétinien, RPE : épithélium pigmentaire rétinien, BV : vaisseaux sanguins [70]

Deux ans plus tard, Fercher et Swanson, indépendamment, réalisent les premières images (Figure 42) *in vivo* d'une rétine humaine avec une résolution axiale de 14  $\mu\text{m}$  et une sensibilité de 94 dB [71].

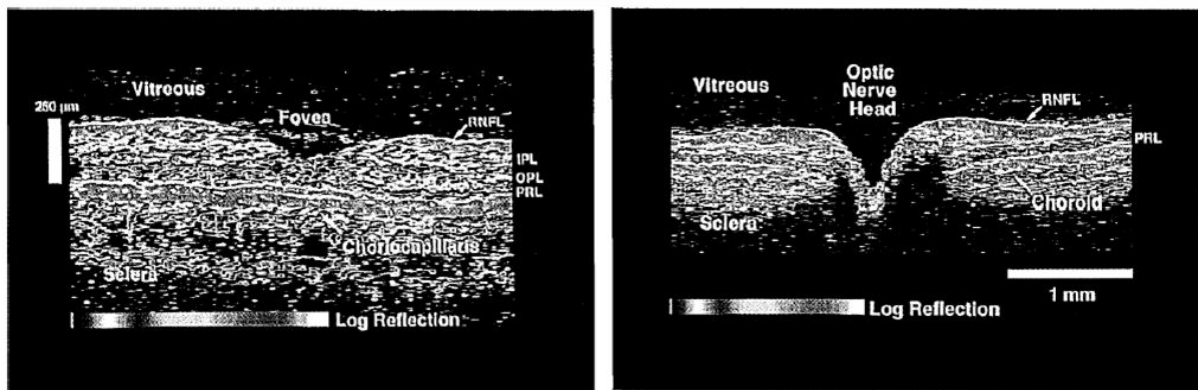


Figure 42 : Tomographes de rétine et de nerf optique *in vivo* [71]

En 1995, Hee et al. réalisent également une image *in vivo* d'une rétine humaine (Figure 43) avec une résolution axiale de 10  $\mu\text{m}$  [72].

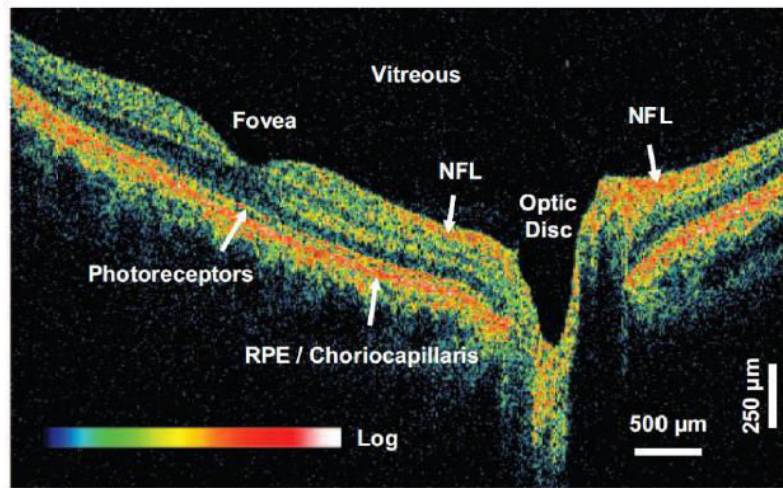


Figure 43 : B-scan d'une rétine humaine [72]

L'OCT pour l'ophtalmologie se développe rapidement avec une amélioration de la sensibilité, de la résolution axiale et de la vitesse d'acquisition.

La vitesse d'acquisition dépend entre autre de la vitesse de déplacement du miroir de référence de l'interféromètre et qui permet un balayage en profondeur de l'échantillon. Le bras de l'interféromètre comprenant le miroir référence est appelé ligne à retard et plusieurs configurations ont été développées avec pour objectif l'augmentation de la vitesse d'acquisition.

- Les premières lignes à retard utilisées sont celles basées sur un miroir en translation mécanique ou avec un matériau piézoélectrique [70].

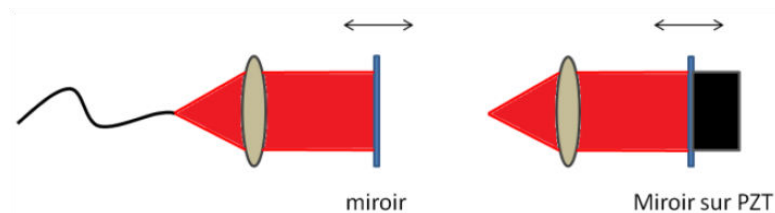
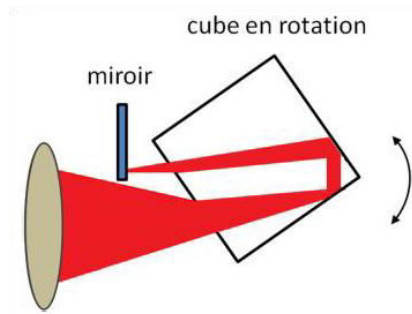


Figure 44 : Lignes à retard avec miroir en translation et sur un matériau piézoélectrique

Elles sont relativement simples à mettre en œuvre mais la vitesse de balayage est faible et le matériau piézoélectrique ne permet que de petits déplacements (quelques dizaines de micromètres). La vitesse d'acquisition est d'environ 100 Hz.

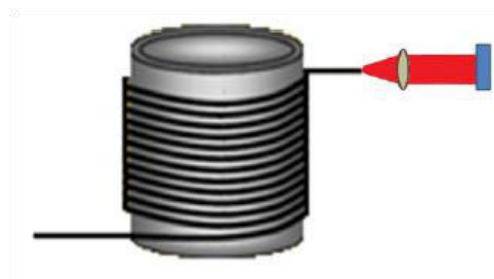
- Avec un cube en rotation [73].



*Figure 45 : ligne à retard avec un cube en rotation*

La rotation du cube permet de modifier la distance optique parcourue par la lumière et d'enregistrer les signaux à différentes profondeurs plus rapidement ( $\sim 400$  Hz). Les défauts de ce système sont : la dispersion induite qui dépend de la distance parcourue dans le cube diminuant la résolution (voir partie III.5) et la distance de balayage qui dépend de la taille du cube. Cependant, il est possible d'avoir un déplacement quasi-linéaire en fonction de l'angle de rotation du cube et de modifier la ligne à retard pour l'adapter à la profondeur de balayage et à la vitesse d'acquisition souhaitée.

- Utilisation d'une fibre optique



*Figure 46 : à retard avec une fibre étirable*

Le principe est d'étirer la fibre optique à l'aide d'un matériau piézoélectrique afin de modifier la distance optique parcourue par le faisceau laser. Elle permet d'avoir des vitesses d'acquisition de 1200 Hz. La principale difficulté de cette configuration est la gestion de la polarisation de la lumière le long de la fibre.

- Utilisation d'un réseau de diffraction [74].

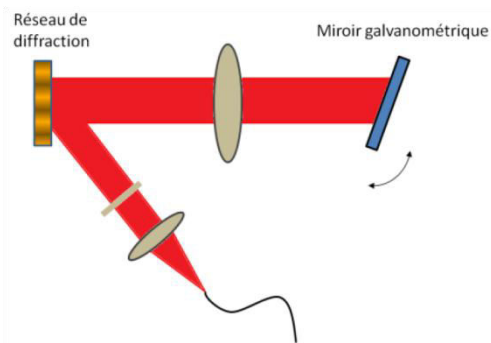


Figure 47 : ligne à retard utilisant un réseau de diffraction et un miroir galvanométrique

Avec cette configuration, le miroir de référence ne se déplace plus mais il est en rotation. Cela permet d'atteindre une vitesse d'acquisition de 2 kHz. De plus, ce miroir est situé au plan focal de la lentille (plan de Fourier), cette ligne à retard permettant de contrôler de manière indépendante le retard de l'impulsion et sa phase. Ainsi, la fréquence des interférences peut être modulée afin de faciliter l'acquisition ou compenser la dispersion induite par le système.

Tearney atteindra ainsi un record de sensibilité (106 dB) avec ce type de système relié à un endoscope utilisant une source avec une largeur de bande de 75 nm et une puissance moyenne de 30 mW (Figure 48). La résolution axiale est 10  $\mu\text{m}$  [75].

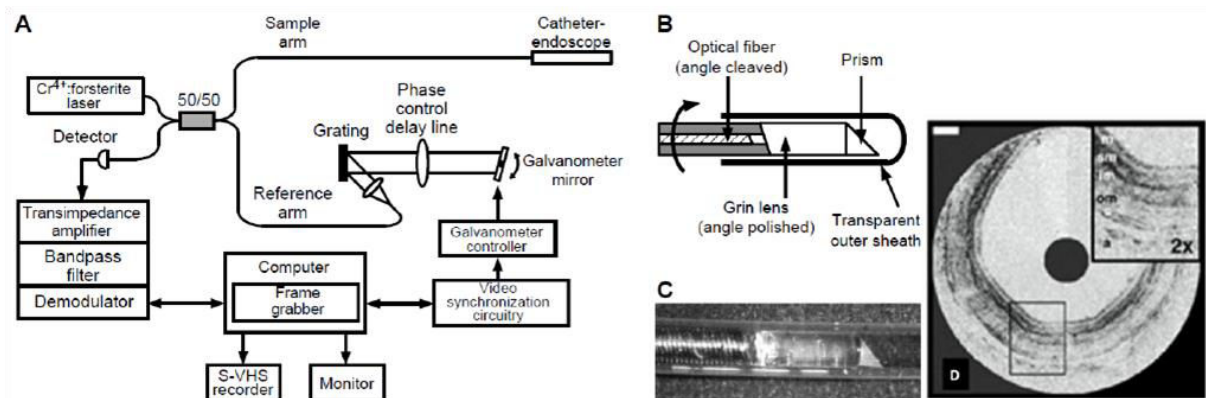


Figure 48 : Système OCT endoscopique (A)Schéma du système, (B)Schéma du cathéter, (C)Photo du cathéter, (D)Image OCT in vivo d'un œsophage de lapin [75]

Grâce aux sources lumineuses telles que les lasers femtosecondes ou les sources lasers supercontinua, la résolution axiale (en profondeur) maximale atteinte est de 1  $\mu\text{m}$  dans les tissus biologiques [76], [77]. Cela nécessite d'utiliser des sources avec une largeur de bande de 370 nm.

Pour l'imagerie de tissus biologiques *in vivo*, il est nécessaire d'avoir une bonne sensibilité ( $\sim 100$  dB). Comme le montre l'équation 23, la sensibilité peut être améliorée en augmentant le temps d'intégration du détecteur ce qui par conséquent diminue la vitesse d'acquisition. Or ce dernier paramètre est aussi important pour imager des tissus vivants dont la structure est susceptible d'évoluer au cours du temps.

C'est pourquoi une autre méthode de détection est mise en œuvre pour obtenir une haute sensibilité et une grande vitesse d'acquisition. La caméra est remplacée par un spectromètre passant d'une détection dans le domaine temporel à une détection dans le domaine spectral.

### 3.2. OCT dans le domaine spectral

Le concept d'OCT dans le domaine fréquentiel a été proposé pour la première fois par Fercher en 1995 [78]. Ce système consiste à enregistrer le signal issu de l'interféromètre par un spectromètre et une caméra linéaire rapide (Figure 49). L'information en profondeur est codée dans les fréquences de modulation du spectre du signal d'interférences [79]. Ce signal n'est plus fonction du temps mais il est enregistré en fonction de la fréquence ou de la longueur d'onde.

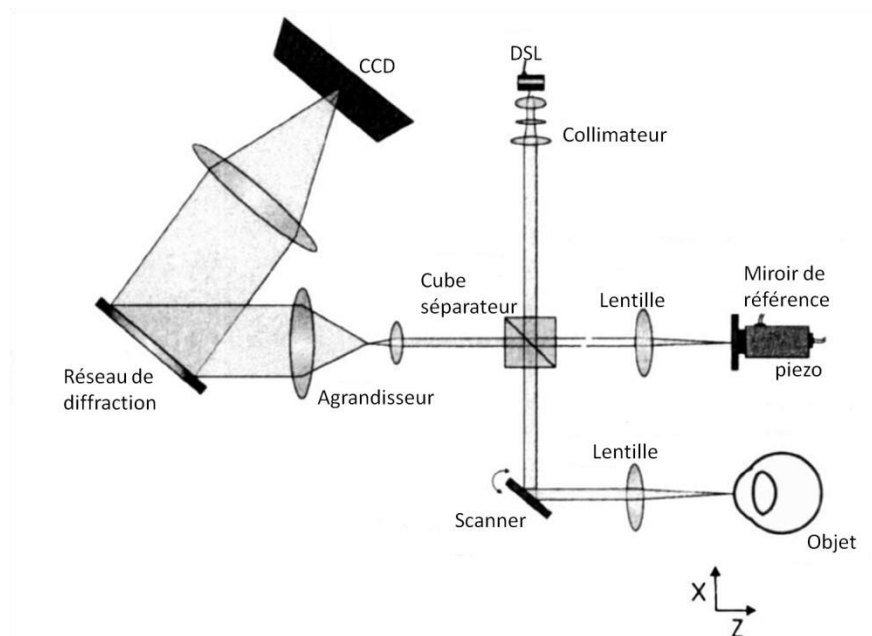


Figure 49 : Configuration classique d'un système FDOCT. DSL, Diode superluminescente [80]

En 2003, trois équipes de recherche, travaillant indépendamment, démontrent les avantages d'un tel concept par rapport à l'imagerie OCT dans le domaine temporel en termes de sensibilité et de vitesse d'acquisition [59], [81], [82]. La première démonstration de l'amélioration de la qualité d'image d'une rétine est réalisée par Wojtkowski en 2002 [80]. 2 ans plus tard il démontre la possibilité de réaliser des images avec une résolution de  $2\text{ }\mu\text{m}$  à une vitesse de 16 000 A-scans par seconde avec un laser femtoseconde (Figure 50) [83].



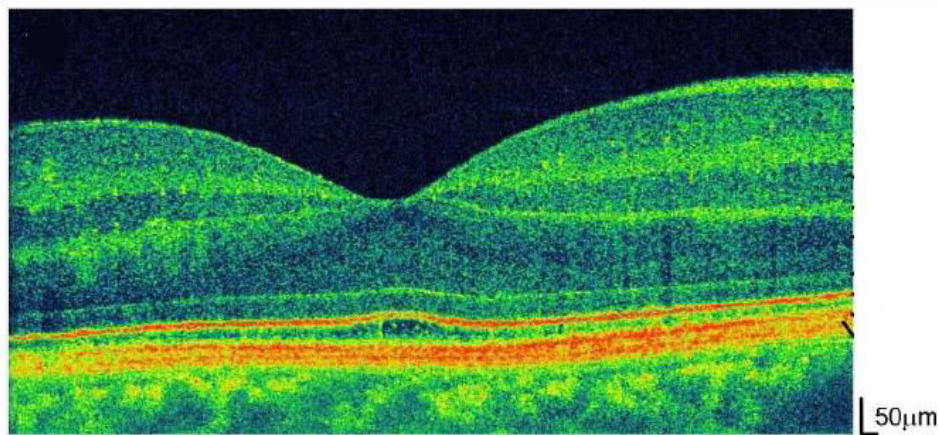


Figure 50 : Image d'une rétine par FDOCT

Une autre méthode de détection a été développée en 1997 par Chinn [84] et Golubovic [85]. Si précédemment, les fréquences sont encodées spatialement, ici, elles sont encodées temporellement. La méthode consiste à utiliser une source laser à balayage avec une fréquence d'émission qui varie avec le temps et un photodétecteur. Cette technique est appelée Swept source OCT.

Les meilleures performances atteintes aujourd'hui sont une résolution axiale de  $2\text{ }\mu\text{m}$  et une vitesse d'acquisition de quelques mega hertz (20 millions de A-scans par seconde) [86].

### 3.3. Comparaison TDOCT / FDOCT

#### 3.3.1. Dans le domaine temporel

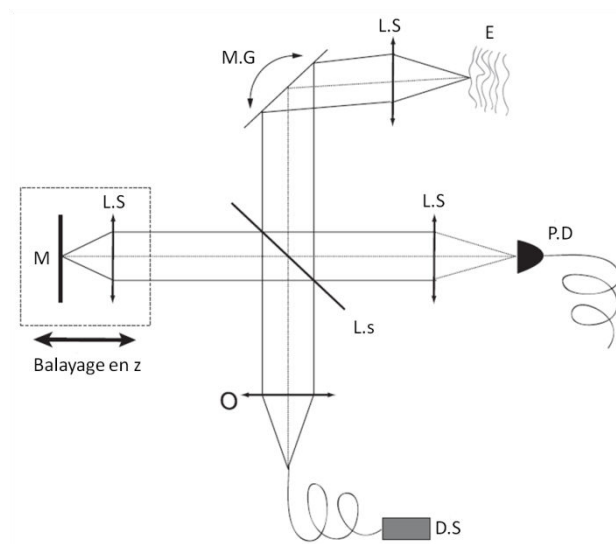


Figure 51 : Montage classique d'un système OCT dans le domaine temporel : L.S, lentille sphérique ; O, Objectif de microscope ; D.S, diode superluminescente ; L.s, lame séparatrice ; M.G, miroirs galvanométriques ; P.D, photodiode ; M, miroir ; E, échantillon [58]

La Figure 51 représente une configuration classique d'un système OCT dans le domaine temporel composé d'un interféromètre de Michelson. La source émet un signal lumineux de puissance  $S_0$  séparé en deux par une lame séparatrice. Une partie du faisceau se propage dans le bras de référence et l'autre partie dans le bras échantillon. Le faisceau référence est réfléchi par un miroir avec un coefficient de réflexion  $R_r$ . La distance entre le miroir et la lame séparatrice est  $z_r$ . Le faisceau échantillon est réfléchi par les différentes interfaces de l'échantillon avec un coefficient de réflexion  $R_s(z_{s_n})$  avec  $z_{s_n}$  la distance entre la lame séparatrice et la n-ième interface de l'échantillon. Chaque interface possède également un coefficient de transmission  $T_{s_n}$  [87]. L'intensité totale réfléchie par l'échantillon peut s'exprimer ainsi :

$$R_s(z_{s_n}) = R_{s_n} \cdot T_{s_{n-1}}^2 \cdot T_{s_{n-2}}^2 \dots T_{s_1}^2 \quad (26)$$

L'intensité lumineuse moyenne dans le temps  $I_D$  au niveau du détecteur peut être exprimée par :

$$I_D = \rho \langle (E_r + E_s)^* \cdot (E_r + E_s) \rangle_t \quad (27)$$

Avec  $\rho$  le rendement quantique du détecteur,  $E_r$  le champ électrique du signal issu du bras de référence et  $E_s$  le champ électrique du signal issu du bras échantillon. Le symbole \* signifie le complexe conjugué.

Le signal obtenu en une acquisition avec une seule interface est :

$$I_D(z_r) = \frac{\rho}{4} [S_0 [R_r + R_s]] + \frac{\rho}{2} [S_0 \sqrt{R_r R_s} e^{-(z_r - z_s)^2 \Delta k^2} \cos[2k_0(z_r - z_s)]] \quad (28)$$

Où le premier terme correspond à la somme des intensités réfléchies par les deux bras appelé fond continu et le deuxième terme au signal d'interférence.

$e^{-(z_r - z_s)^2 \Delta k^2}$  est la fonction de cohérence dont la largeur à mi-hauteur correspond à la longueur de cohérence  $l_c$  qui s'exprime ainsi :

$$l_c = \frac{2\sqrt{\ln(2)}}{\Delta k} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad (29)$$

Un A-scan est obtenu par intégration de tous les nombres d'onde et pour l'ensemble des distances  $z_r$  dans l'échantillon, le signal est :

$$I_D(z_r) = \frac{\rho}{4} [S_0 [R_r + R_{s_1} + R_{s_2} + \dots + R_{s_n}]] + \frac{\rho}{2} \left[ S_0 \sum_{n=1}^N \sqrt{R_r R_{s_n}} e^{-(z_r - z_{s_n})^2 \Delta k^2} \cos[2k_0(z_r - z_{s_n})] \right] \quad (30)$$

La Figure 52 montre le résultat de la convolution entre  $I_D(z_r)$  et la fonction de cohérence de la source (avec un échantillon à deux interfaces).

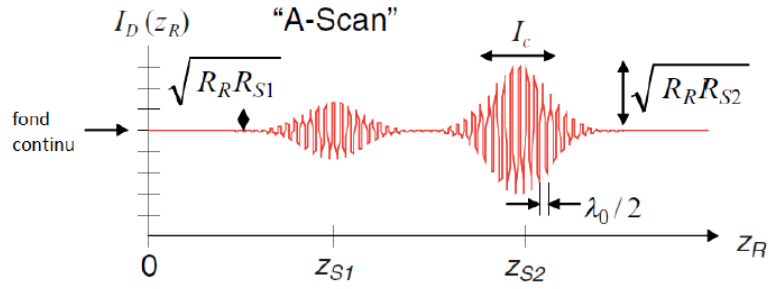


Figure 52 : A-scan dans le domaine temporel [6]

### 3.3.2. Dans le domaine fréquentiel

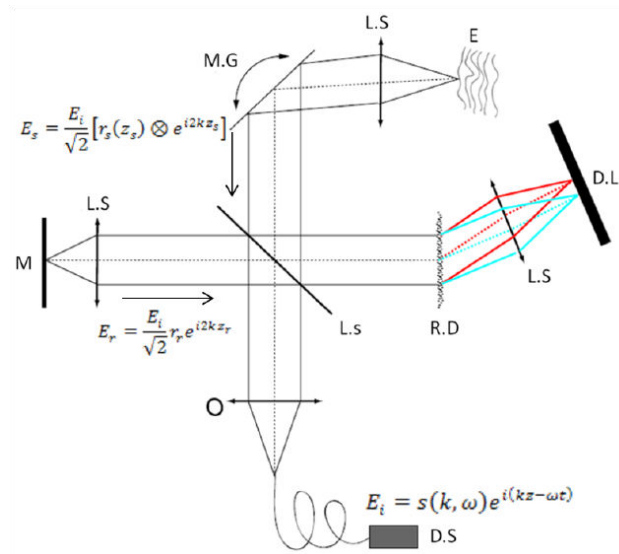


Figure 53 : Montage classique d'un système OCT dans le domaine fréquentiel : L.S, lentille sphérique ; O, Objectif de microscope ; D.S, diode superluminescente ; L.s, lame séparatrice ; M.G, miroirs galvanométriques ; R.D, réseau de diffraction ; D.L, détecteur linéaire ; M, miroir ; E, échantillon (modifiée à partir de [58])

La Figure 53 représente un schéma d'un interféromètre de Michelson avec comme détecteur un spectromètre. La source lumineuse polychromatique émet un champ électrique qui peut être exprimé sous sa forme complexe  $E_i = s(k, \omega) e^{i(kz - \omega t)}$ .  $s(k, \omega)$  est l'amplitude du champ électrique en fonction du nombre d'onde  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  et de la fréquence  $\omega = 2\pi\nu$  avec  $\nu = \frac{c}{\lambda}$  ( $c$  est la vitesse de la lumière dans le vide). Comme dans le domaine temporel, le cube séparateur divise, équitablement en terme d'amplitude du champ électromagnétique, en deux le faisceau. Le faisceau référence est réfléchi par un miroir avec un coefficient de réflexion en intensité  $R_r$ . La distance entre le miroir et la lame séparatrice est  $z_r$ . Le faisceau échantillon est réfléchi par les différentes interfaces de l'échantillon avec un coefficient de réflexion en intensité  $R_s(z_s)$  avec  $z_s$  la distance entre le cube séparateur et une interface de l'échantillon.

L'ensemble des réflexions de l'échantillon est exprimé sous la forme :  $r_s(z_s) = \sum_{n=1}^N r_{s_n} \cdot t_{s_{n-1}}^2 \cdot t_{s_{n-2}}^2 \dots t_{s_1}^2 \delta(z_s - z_{s_n})$  avec  $t_{s_n} = \sqrt{T_{s_n}}$  et  $r_s(z_s) = \sqrt{R_s(z_s)}$ . Le champ électrique après retour de l'échantillon est exprimé sous la forme  $E_s = \frac{E_i}{\sqrt{2}} [r_s(z_s) \otimes e^{i2kz_s}]$ , où  $\otimes$  représente le produit de convolution et le facteur 2 dans l'exponentielle exprime l'aller-retour de la lumière dans l'échantillon. En considérant que ce signal est composé de réflexions discrètes, le signal devient  $E_s = \frac{E_i}{\sqrt{2}} \cdot \sum_{n=1}^N r_{s_n} \cdot t_{s_{n-1}}^2 \cdot t_{s_{n-2}}^2 \dots t_{s_1}^2 e^{i2kz_{s_n}}$ . De la même manière, le champ électrique  $E_r$  issu du miroir de référence est  $E_r = \frac{E_i}{\sqrt{2}} r_r e^{i2kz_r}$ . Ces deux champs retraversent le cube séparateur puis interfèrent au niveau du détecteur dont le signal est :

$$I_D(k, \omega) = \frac{\rho}{2} \left\langle \left| \frac{s(k, \omega)}{\sqrt{2}} r_r e^{i(2kz_r - \omega t)} + \frac{s(k, \omega)}{\sqrt{2}} \sum_{n=1}^N r_{s_n} \cdot t_{s_{n-1}}^2 \cdot t_{s_{n-2}}^2 \dots t_{s_1}^2 e^{i(2kz_{s_n} - \omega t)} \right|^2 \right\rangle \quad (31)$$

En développant cette équation, on obtient :

$$I_D(k, \omega) = \frac{\rho}{4} [S(k)(R_r + R_{s_1} + \dots + R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2)] + \frac{\rho}{4} \left[ S(k) \sum_{n=1}^N \sqrt{R_r R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2} (e^{i2k(z_r - z_{s_n})} + e^{-i2k(z_r - z_{s_n})}) \right] + \frac{\rho}{4} \left[ S(k) \sum_{n=1}^N \sqrt{R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2 R_{s_m} T_{s_{m-1}}^2 \dots T_{s_1}^2} (e^{i2k(z_{s_n} - z_{s_m})} + e^{-i2k(z_{s_n} - z_{s_m})}) \right] \quad (32)$$

Avec  $S(k)$  la densité spectrale de la source.

Soit en utilisant les formules d'Euler :

$$I_D(k, \omega) = \frac{\rho}{4} [S(k)(R_r + R_{s_1} + \dots + R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2)] + \frac{\rho}{2} \left[ S(k) \sum_{n=1}^N \sqrt{R_r R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2} (\cos[2k(z_r - z_{s_n})]) \right] + \frac{\rho}{2} \left[ S(k) \sum_{n=1}^N \sqrt{R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2 R_{s_m} T_{s_{m-1}}^2 \dots T_{s_1}^2} \cos[2k(z_{s_n} - z_{s_m})] \right] \quad (33)$$

Cette relation est composée de trois termes :

- Le fond continu, c'est la somme en intensité des réflexions issues des bras référence et échantillon.
- L'inter-corrélation est le signal d'interférence entre chaque réflexion issue de l'échantillon et la référence. C'est le signal d'intérêt en OCT.
- L'auto-corrélation représente les interférences entre les différentes réflexions de l'échantillon considérées comme des artefacts. Cependant ce terme peut devenir négligeable avec une intensité suffisamment importante dans le bras référence.

Dans le domaine spectral, le signal  $I_D(k)$  est enregistré. Numériquement, une transformée de Fourier inverse est réalisée pour retrouver un signal en fonction de la profondeur dans l'échantillon. On obtient :

$$\begin{aligned}
i_D(z) = & \frac{\rho}{8} \left[ \gamma(z) [R_r + R_{s_1} + R_{s_2} T_{s_1}^2 + \dots + R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2] \right. \\
& + \frac{\rho}{4} \left[ \gamma(z) \otimes \sum_{n=1}^N \sqrt{R_r R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2} \left( \delta(z \pm 2(z_r - z_{s_n})) \right) \right] \\
& + \frac{\rho}{8} \left[ \gamma(z) \right. \\
& \left. \otimes \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2 R_{s_m} T_{s_{m-1}}^2 \dots T_{s_1}^2} \left( \delta(z \pm 2(z_{s_n} - z_{s_m})) \right) \right] \Big]
\end{aligned} \tag{34}$$

Avec  $\gamma(z)$  la transformée de Fourier de  $S(k)$ , soit la fonction de cohérence de la source. Le résultat de la mesure interférométrique appelé A-scan est exprimé ainsi :

$$\begin{aligned}
i_D(z) = & \frac{\rho}{8} \left[ \gamma(z) [R_r + R_{s_1} + R_{s_2} T_{s_1}^2 + \dots + R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2] \right. \\
& + \frac{\rho}{4} \sum_{n=1}^N \sqrt{R_r R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2} \left[ \gamma[2(z_r - z_{s_n})] + \gamma[-2(z_r - z_{s_n})] \right] \\
& + \frac{\rho}{8} \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{s_n} T_{s_{n-1}}^2 \dots T_{s_1}^2 R_{s_m} T_{s_{m-1}}^2 \dots T_{s_1}^2} \left[ \gamma[2(z_{s_n} - z_{s_m})] \right. \\
& \left. + \gamma[-2(z_{s_n} - z_{s_m})] \right] \Big]
\end{aligned} \tag{35}$$

Graphiquement, le résultat obtenu pour un échantillon à deux interfaces est présenté dans la Figure 54.

La position 0 correspond à la position du miroir de référence  $z_r$ . Les distances des réflexions sont doublées, ce qui représente l'aller-retour de la lumière réfléchie dans l'échantillon. La largeur des pics est directement liée à la cohérence de la source lumineuse.

En plus du profil d'intensité recherché correspondant aux différentes interfaces de l'échantillon à différentes profondeurs, d'autres résultats sont visibles appelés artefacts. Tout d'abord des termes miroirs apparaissent de l'autre côté de la position de référence. Ils représentent les termes conjugués de la transformée de Fourier (Figure 54). Ces termes

peuvent être « supprimés » numériquement en ne sélectionnant que les termes d'inter-corrélation. Les autres artefacts sont le terme continu et les termes d'autocorrélation.

Le terme continu est centré sur la position de référence. Son amplitude, qui provient principalement de la réflexion du miroir de référence, est plus grande que le signal d'intérêt ce qui rend ce dernier difficilement visible. Pour éliminer le terme continu, le plus simple est d'enregistrer le signal continu sans échantillon et de le soustraire aux mesures acquises avec échantillon.

Le terme d'autocorrélation se situe proche de la position 0, les distances entre chaque interface de l'échantillon étant plus petites que celle entre le miroir de référence et l'échantillon. La meilleure méthode pour éliminer ce terme est de s'assurer que l'amplitude du signal référence est suffisante pour que celle du terme d'intercorrélacion soit bien supérieure à celle du terme d'autocorrélation.

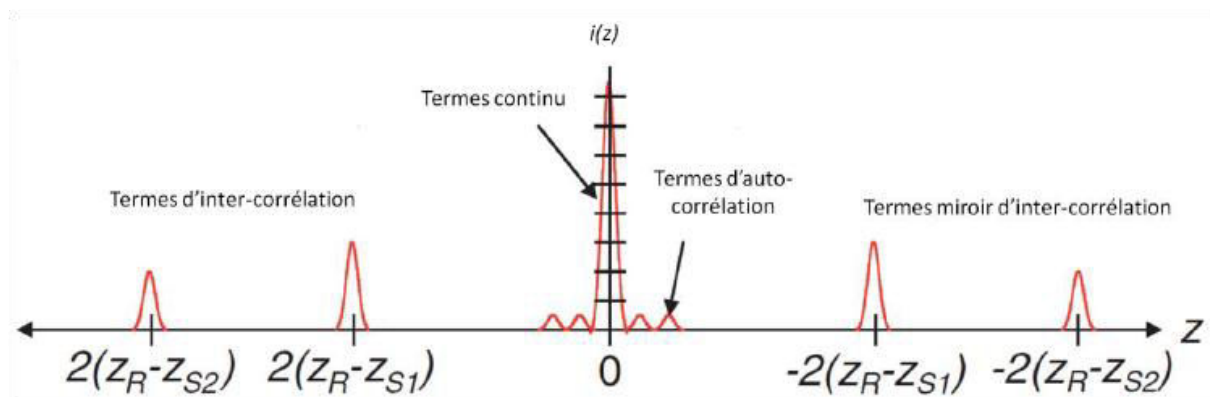


Figure 54 : Illustration d'une mesure A-scan d'un échantillon à deux interfaces [6]

### 3.3.3. Avantages / Inconvénients

Le gain en vitesse d'acquisition est relativement simple à comprendre car pour un même temps d'intégration permettant l'acquisition d'un point dans le domaine temporel, un A-scan est directement obtenu dans le domaine fréquentiel. De plus, les détecteurs utilisés sont aujourd'hui des capteurs linéaires CMOS qui fonctionnent jusqu'à des fréquences de 100 kHz.

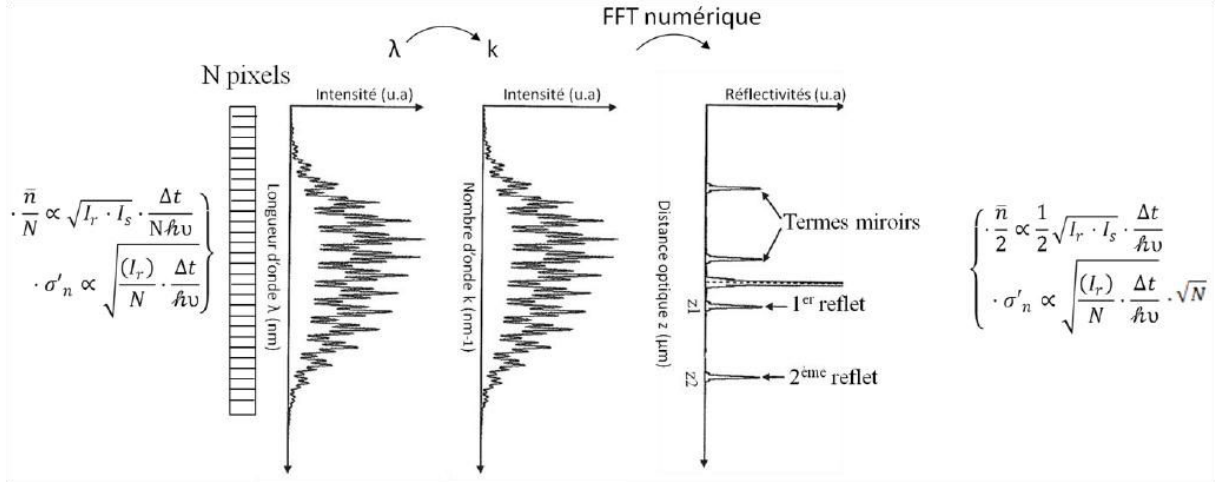


Figure 55 : Amélioration du rapport signal à bruit, entre l'acquisition du signal et l'obtention du A-scan (modifiée de [88])

Le gain en sensibilité est dû à la méthode de détection qui permet d'augmenter le rapport signal à bruit en appliquant deux transformées de Fourier (Figure 55). En effet, dans le domaine fréquentiel, le détecteur est un spectromètre qui disperse le signal issu de l'interféromètre sur un certain nombre  $N$  de pixels donnant un signal en fonction de la longueur d'onde  $\lambda$ .

Pour chaque pixel, l'intensité du signal et la variance du bruit peuvent être exprimés ainsi [89] :

$$S_{\text{pixel}} \propto \sqrt{I_r I_s} \cdot \frac{\Delta t}{N h \nu} \quad (36)$$

$$\sigma'_n \propto \sqrt{\frac{I_r + I_s}{N} \cdot \frac{\Delta t}{h \nu}} \quad (37)$$

Avec  $I_r \gg I_s$ , le rapport signal à bruit dans le domaine temporel est :

$$SNR_{TDOCT} = \frac{S_{\text{pixel}}^2}{\sigma_n'^2} = I_s \cdot \frac{\Delta t}{N h \nu} \quad (38)$$

Dans le domaine fréquentiel, le signal est exprimé en fonction du nombre d'onde  $k$  et une transformée de Fourier est effectuée pour exprimer le signal en fonction de la distance  $z$ . Le signal est « reconcentré » en un pixel alors que le bruit est multiplié par  $\sqrt{N}$ .

Le rapport signal à bruit dans le domaine fréquentiel peut s'exprimer ainsi :

$$SNR_{FDOCT} = \frac{\left( \frac{1}{2} \sqrt{I_r I_s} \frac{\Delta t}{h \nu} \right)^2}{\left( \frac{1}{2} \sqrt{\frac{I_r}{N} \cdot \frac{\Delta t}{h \nu}} \cdot \sqrt{N} \right)^2} = I_s \frac{\Delta t}{h \nu} \quad (39)$$

Soit :

$$SNR_{FDOCT} = SNR_{TDOCT} * N \quad (40)$$

Dans le domaine fréquentiel, avec un détecteur composé de 1024 pixels, la sensibilité est augmentée de 30 dB ( $10\log(1024)$ ) par rapport à une détection dans le domaine temporel.

Cependant le SNR dépend aussi de la densité spectrale de la source, de la largeur de bande de détection des détecteurs et de la puissance lumineuse. Cette dernière est d'ailleurs dépendante de la profondeur de l'échantillon. En effet l'intensité de la réflexion de la première interface sera supérieure aux autres à cause des phénomènes de diffusion et d'absorption dans l'échantillon. Cela signifie que la sensibilité est aussi dépendante de la profondeur.

La principale limitation du système est la résolution du spectromètre qui impacte directement la résolution spectrale et par conséquent, en passant par la transformée de Fourier inverse, impacte la résolution axiale [6].

### 3.4. Scan free OCT

L'OCT dans le domaine temporel est limitée en terme de vitesse par la nécessité de déplacer le miroir de référence pour avoir un signal d'interférences. En revanche, la sensibilité est indépendante de la profondeur de l'échantillon analysé. L'OCT dans le domaine de Fourier possède une vitesse d'acquisition et une sensibilité bien supérieures mais cette dernière est dépendante de la profondeur analysée. Pour corriger cela, des méthodes numériques existent mais requièrent un temps de calcul non négligeable [58].

Le système scan free OCT se situe entre les deux configurations précédentes. En l'occurrence, il s'agit d'une détection dans le domaine temporel mais sans déplacement du miroir de référence.

Le principe utilisé aujourd'hui pour le scan free OCT est issu d'une technique mise en place en 1957 par Connes [90] pour dépasser les limites de résolution/temps de calcul de la spectroscopie par transformation de Fourier. Il s'agissait effectivement de proposer un spectromètre à réseaux permettant de s'affranchir du temps de calcul nécessaire pour retrouver le spectre mesuré par transformée de Fourier. Ce système appelé SISAM (Figure 56), pour Spectromètre Interférentiel par Sélection de l'Amplitude et de la Modulation, est composé d'un interféromètre de Michelson avec deux réseaux de diffraction à la place des miroirs [91].



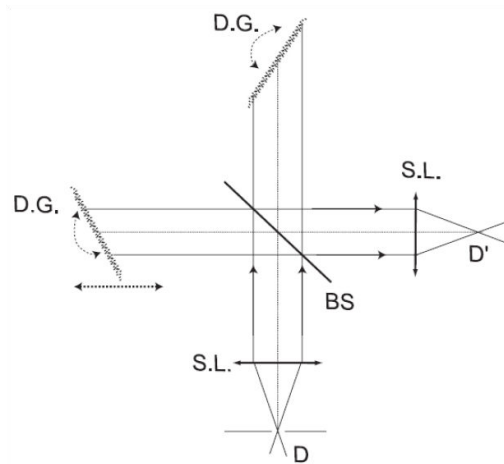


Figure 56 : Schéma du SISAM : DG, réseaux de diffraction ; BS, lame séparatrice ; SL, lentilles sphériques ; D', image de D [58]

La rotation des deux réseaux dans la même direction et avec le même angle permet un scan du spectre avec une résolution proche de la résolution des réseaux. La translation de l'un des deux réseaux permet de modifier le chemin optique ce qui induit une modulation de phase de la longueur d'onde étudiée avec un contraste des franges dépendant de l'intensité de celle-ci par rapport aux autres longueurs d'onde dans le spectre. Ce système est utilisé pour la première fois pour de l'imagerie en temps de vol en 1997 par Verrier *et al.* pour mesurer la différence de temps de propagation (correspondant à des distances de l'ordre de 150  $\mu\text{m}$ ) entre des modes dans une fibre quasi monomode [91]. En 1996, Zeylikovitch propose un système similaire utilisant un seul réseau et permettant de visualiser l'intercorrélacion d'une seule impulsion [92].

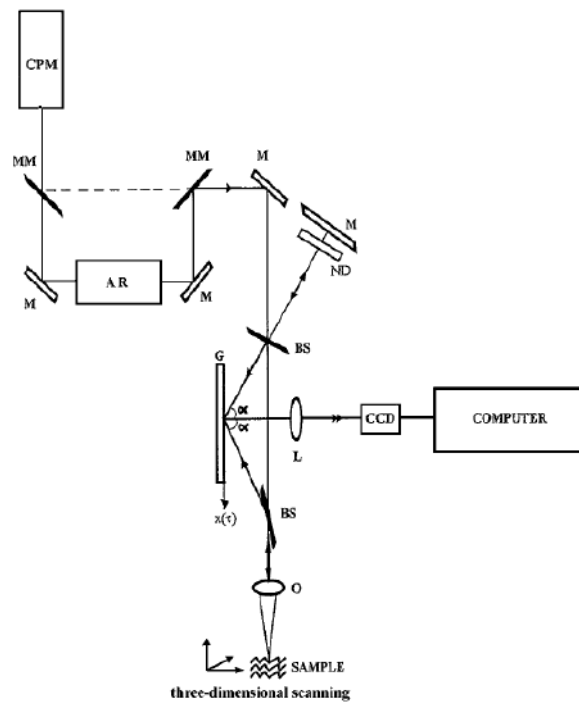


Figure 57 : Schéma du système : MM, miroirs de transfert ; M, miroir ; ND, densité optique variable ; BS, lame séparatrice ; L, lentille ; O, objectif de focalisation  $\times 5$  ; G, réseau de

*diffraction ; AR, amplificateur ; CPM, source laser impulsif [93]*

Il démontre un an plus tard la capacité de ce système à réaliser des A-scans d'échantillons diffusants stationnaires ou en rotation en utilisant une seule impulsion (Figure 57) [93]. En 1998, il réalise le premier B-scan en temps réel d'une lame de verre. Cette image 2D est réalisée sans déplacer d'éléments optiques [94].

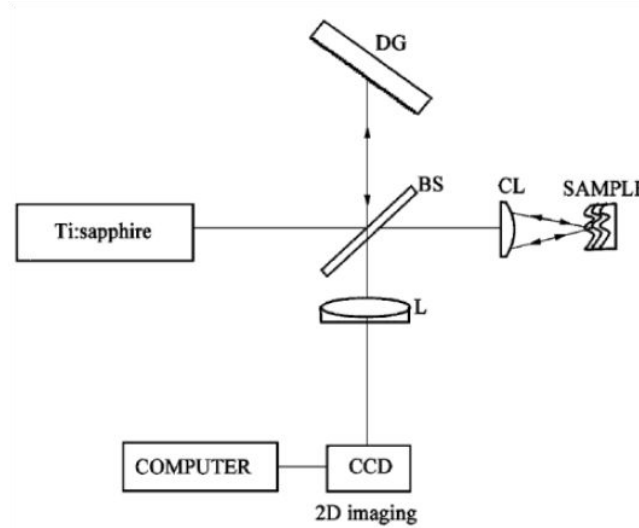


Figure 58 : Schéma de principe pour l'imagerie 2D : BS, lame séparatrice ; DG, réseau de diffraction ; L, objectif ; CL, lentille cylindrique [94]

Le réseau de diffraction est placé dans le bras référence en configuration Littrow (Figure 58). Une ligne de l'échantillon et du réseau est imagée sur une caméra CCD par une lentille de focale 5 cm. Le réseau introduit un retard optique linéaire dans la direction correspondant à l'axe des abscisses sur la caméra. Le retard temporel maximal  $\tau$  dépend de la taille du faisceau  $D$ , du pas du réseau  $\Lambda$  et de l'angle  $\alpha$  entre la normale au réseau et le faisceau.

$$\tau = \frac{D}{c \cdot \Lambda \cdot \cos \alpha} \quad (41)$$

Pour cette expérience, la taille du faisceau est 2,5 mm correspondant à un retard temporel de 13,5 ps, c'est-à-dire une profondeur analysable de l'échantillon de 2 mm.

C'est en 2006 que Watanabe réalise la première image *in vivo* sur un échantillon biologique avec une sensibilité de 90 dB et une vitesse d'acquisition de 10 Hz pour des B-scans [95].

La même année, un système fibré est proposé avec l'utilisation d'un réseau de diffraction en transmission [96]. Il présente une propriété intéressante du réseau qui consiste à diminuer la fréquence de modulation des franges. Cela permet notamment d'utiliser des capteurs avec un nombre de pixels standard pour imager sur une profondeur de quelques millimètres. Ce principe étant utilisé dans notre système, ce phénomène sera expliqué dans la partie suivante.

Aujourd'hui, les meilleures performances ont été obtenues par Watanabe avec une vitesse d'acquisition de 47 kHz pour des A-scans, une sensibilité de 93 dB et une résolution axiale de 14  $\mu\text{m}$  (Figure 59) [97]. Il utilise pour cela une caméra CMOS linéaire de 512 pixels avec une

vitesse d'acquisition de 47 000 lignes /s et une diode superluminescente de longueur d'onde 1,33  $\mu\text{m}$  et une largeur spectrale de 57,6 nm.

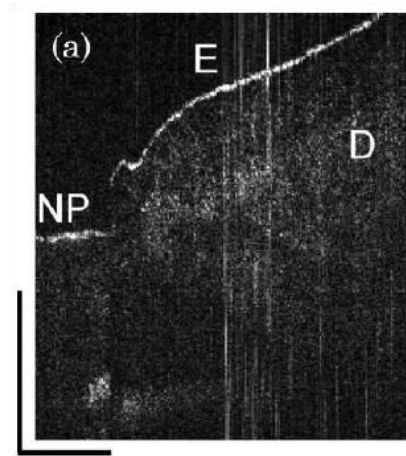


Figure 59 : Image OCT d'une région du doigt proche d'un ongle, NP : ongle ; E, épiderme ; D, derme (dimension image : latérale 4mm x axiale 2,6 mm) [97]

Le système que j'ai contribué à développer au sein de notre laboratoire [58] a un principe de fonctionnement identique à ceux présentés dans les paragraphes précédents mais son architecture diffère : c'est un système OCT dans le domaine temporel utilisant un réseau de diffraction unique. Ce système présente des propriétés intéressantes de traitement du signal optique comme la mesure spectroscopique dépendante de la profondeur de l'échantillon [98] et la compensation de dispersion [99], [100].

#### 4. Principe et architecture du système Scan-free OCT

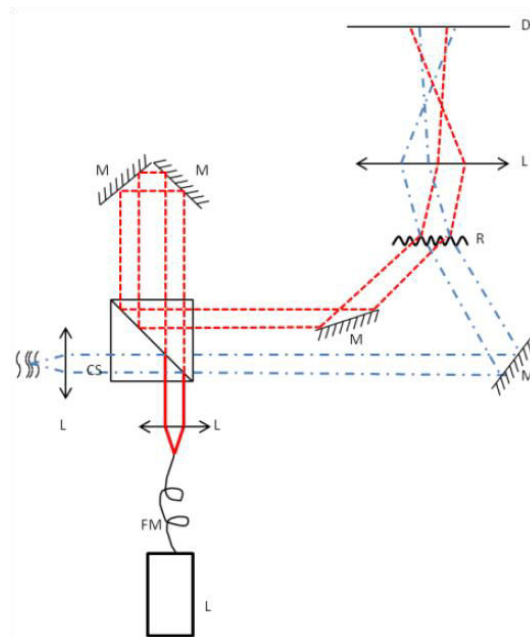


Figure 60 : Schéma de principe du dispositif OCT. L : laser supercontinuum, FM : fibre monomode, L : lentilles, M : miroirs, CS : cube séparateur, D : détecteur

La Figure 60 montre un schéma détaillé du système OCT. Ce dispositif peut être décomposé essentiellement en trois parties : un interféromètre de Linnik, une unité de détection et la source supercontinuum. Dans ce qui suit, sont décrits tous les composants optiques du dispositif, les chemins parcourus par les faisceaux depuis la source lumineuse jusqu'à leur arrivée au détecteur et l'unité de détection qui permet d'afficher des tomogrammes OCT.

#### 4.1.Source laser supercontinuum

Le choix de la source lumineuse dans un système OCT tel que le nôtre est d'une grande importance car celle-ci a une influence sur la sensibilité du système (dépend de la brillance de la source) et sur la résolution axiale de l'image obtenue (dépend de sa largeur spectrale). Différentes sources sont utilisées dans les systèmes OCT comme les lampes thermiques, au tungstène-halogène par exemple. Ces sources lumineuses émettent dans le visible et l'infrarouge. Elles présentent un spectre lisse et stable mais si la source est filtrée pour être spatialement monomode et filtrée spectralement pour avoir une largeur à mi-hauteur de 200 nm autour de 600 nm par exemple, la puissance moyenne sera de l'ordre du microwatt. C'est une puissance bien trop faible pour faire de l'imagerie en temps réel car le temps d'intégration nécessaire serait de plusieurs secondes. De plus, cette faible puissance entraîne une profondeur de pénétration dans l'échantillon faible (quelques centaines de micromètres). Ces sources sont néanmoins utilisées dans les systèmes OCT plein champ de très haute résolution au détriment de la vitesse d'acquisition [101], [102].

Les sources les plus utilisées sont les diodes super luminescentes. Leur largeur spectrale à mi-hauteur est moindre ( $< 100$  nm) mais leur puissance est très supérieure (jusqu'à 10 mW) ce qui permet de réduire le temps d'intégration à quelques millisecondes. Les lasers femtoseconde sont utilisés pour obtenir une très haute résolution car ces sources peuvent présenter une large bande spectrale ( $> 300$  nm) et elles ont aussi une puissance moyenne élevée [77]. Les défauts de ces sources sont leur prix très élevé et leur encombrement important. Parmi ce parc de sources lumineuses, les lasers supercontinuum présentent un grand intérêt dans les systèmes OCT car ils possèdent une bande spectrale s'étendant de 400 nm à 2000 nm avec une puissance moyenne de quelques mW/nm. De plus leur prix est plus abordable que la précédente source et leur compacité est améliorée.

Pour notre travail, c'est une source laser supercontinuum de la société Leukos Innovative Optical Systems qui est utilisée. Elle émet sur une très large bande spectrale ( $300 \text{ nm} < \lambda < 2500 \text{ nm}$ ) des impulsions d'une durée de 1 ns à une fréquence de 100 kHz. Pour notre application et en utilisant des filtres optiques, la largeur de bande utilisée est de 500 à 750 nm. Pour cette gamme de longueur d'onde, le laser émet une puissance d'environ 5 mW. Un objectif de microscope x20 est utilisé pour collimater le faisceau puis un agrandisseur de faisceau (x2) permet d'adapter la taille du faisceau au système. Enfin deux miroirs amènent le faisceau dans le système de manière à ce qu'il se propage parallèlement au plan de mesure.

#### 4.2.Interféromètre

Une fois la largeur de bande spectrale sélectionnée par les filtres, le faisceau traverse un interféromètre de Linnik. Celui-ci est composé d'un cube séparateur 50/50 qui divise le faisceau en deux parties. L'un des deux faisceaux, appelé faisceau référence, est ensuite réfléchi par des miroirs « référence » qui constituent une ligne à retard. L'autre faisceau, appelé faisceau échantillon, est focalisé sur l'échantillon étudié à l'aide d'un objectif de microscope par exemple. Le choix de l'objectif se fera en fonction de la résolution latérale  $d$  voulue avec la relation suivante (correspondant à la tâche d'Airy) :

$$d = \frac{1,22 \cdot \lambda}{2ON} \quad (42)$$

Avec  $\lambda$  la longueur d'onde centrale et  $ON$  l'ouverture numérique de l'objectif. Une grande ouverture numérique permet d'avoir une bonne résolution, par contre moins d'énergie lumineuse sera récupérée en retour ce qui induit une perte de sensibilité du système et une plus faible profondeur « visible » dans l'échantillon. En effet, la profondeur de champ dépend de la taille du faisceau au point focal. Elle correspond à la distance de Rayleigh (aussi appelée paramètre confocal). Elle est définie comme étant :

$$b = \frac{2\pi\omega^2}{\lambda} \quad (43)$$

Avec  $\omega$  le rayon du point de focalisation.

De plus, ce genre d'objectif a une distance de travail très courte ( $< 2$  mm), ce qui peut poser problème pour la disposition de l'échantillon.

Pour notre système, la lentille utilisée est une lentille télécentrique de chez Thorlabs qui fonctionne entre 400 nm et 700 nm avec un grandissement de 4,6x. Sa distance de travail est de 25 mm. Pour une taille de faisceau en entrée de 4 mm, la taille du spot focalisé est de 10  $\mu$ m. La lentille est dite télécentrique car le faisceau focalise toujours parallèlement à l'axe optique (Figure 61). Elle peut être associée à des miroirs galvanométriques pour un balayage rapide sur l'échantillon. Cependant pour les travaux effectués pendant la thèse, des platines motorisées sont utilisées, comme pour le système fibré présenté dans la partie II de ce mémoire. C'est donc l'échantillon qui se déplace.

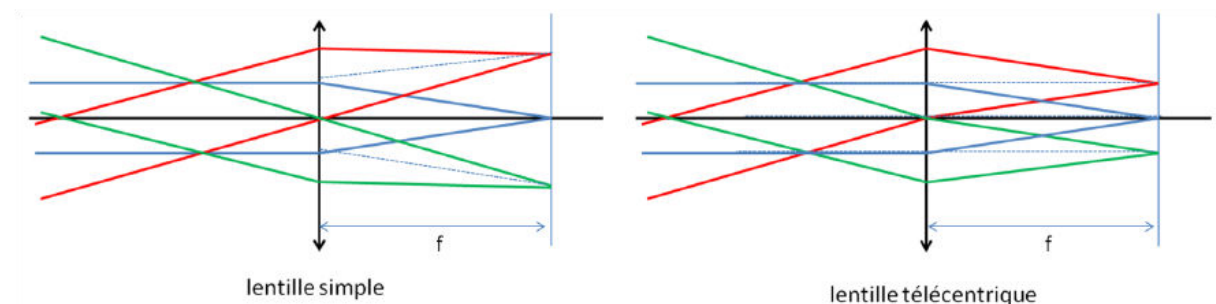


Figure 61 : Focalisation d'une lentille simple (à gauche) et d'une lentille télécentrique (à droite)

Les deux faisceaux référence et échantillon retraversent ensuite le cube séparateur et se superposent spatialement, à l'aide de miroirs, sur un réseau de diffraction (600 traits/mm).

Suivant la position du miroir référence, les deux faisceaux se superposent également temporellement. Dans ce cas, il y a des interférences au niveau du réseau. La particularité de cette configuration est que ces faisceaux arrivent avec un angle  $\pm \theta_i$ . C'est cela qui permet de réaliser un A-scan en une seule acquisition sans déplacer le miroir de référence.

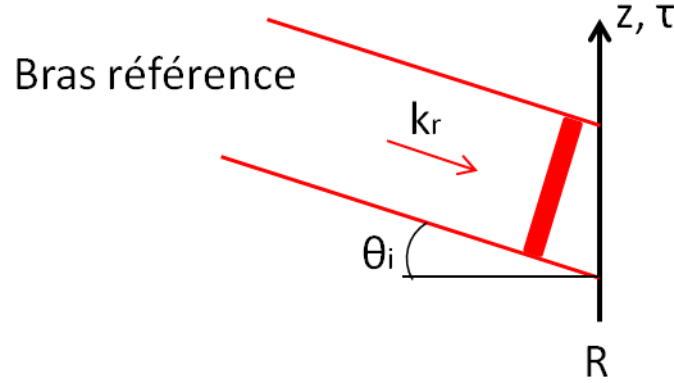


Figure 62 : Schéma de l'arrivée d'un train d'onde sur le réseau

La Figure 62 permet de comprendre comment l'axe du réseau devient un axe de retard optique. En effet, la surface d'onde plane perpendiculaire à la direction du faisceau arrive sur le réseau avec un angle  $\theta_i$ . La partie haute de la surface d'onde atteint le réseau avant la partie basse qui a donc un retard optique par rapport à la partie haute. Si on appelle  $Z$  l'axe correspondant à une distance le long du réseau et l'axe  $\tau$  l'axe temporel alors le retard optique  $\tau_0$  est :

$$\tau_0 = \frac{z \cdot \sin(\theta_i)}{c} \quad (44)$$

Avec  $c$  la vitesse de la lumière.

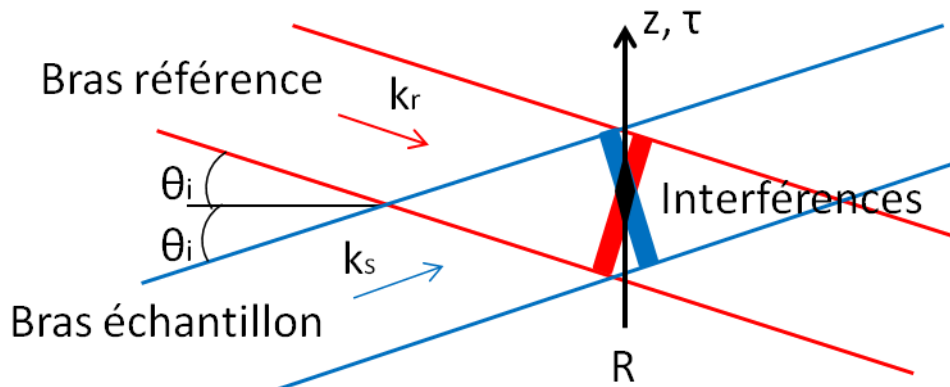


Figure 63 : incidence des deux trains d'onde référence et échantillon sur le réseau

La Figure 63 montre l'incidence des deux faisceaux sur le réseau. Pour le faisceau du bras échantillon, le retard optique  $\tau$  est :

$$\tau = \frac{z \cdot \sin(-\theta_i)}{c} \quad (45)$$

Le retard relatif entre les deux ondes est donc :

$$\Delta\tau = 2 \cdot \frac{z \cdot \sin(\theta_i)}{c} \quad (46)$$

Si les ondes des deux bras de l'interféromètre  $E_{réf}$  et  $E_{échant}$  sont définies comme :

$$E_{réf,échant} = E_{1,2} e^{i\omega t_{1,2}} \quad (47)$$

Alors l'intensité sur le réseau est :

$$I(z) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \int_v \cos\left(2\pi v \cdot 2 \sin(\theta_i) \cdot \frac{z}{c}\right) dv \quad (48)$$

Pour la suite du manuscrit, les calculs sont effectués avec la fréquence centrale des impulsions. L'intensité au niveau du réseau peut s'exprimer ainsi :

$$I(z) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin(\theta_i) \cdot z\right) \quad (49)$$

La fréquence des franges dépend de l'angle d'incidence  $\theta_i$ .

Si l'échantillon émet deux réflexions alors le long de l'axe du réseau, on retrouve deux figures d'interférences (Figure 64) :

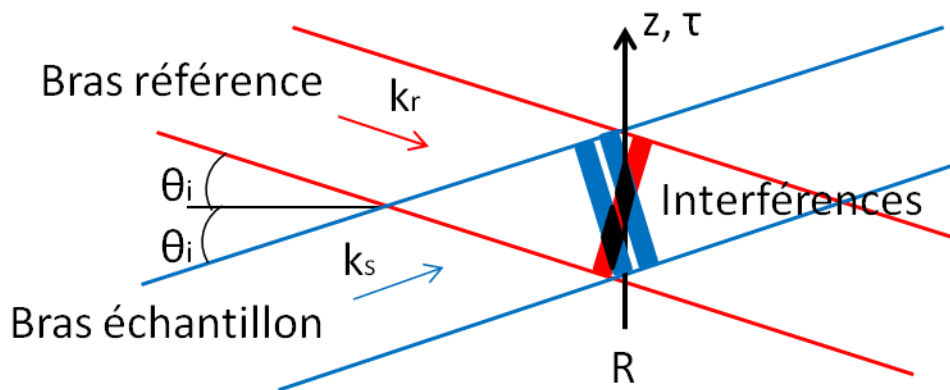


Figure 64 : Interférences localisées dans le faisceau le long de l'axe du réseau

#### 4.3. Détection

D'après l'équation 49, la fréquence spatiale des franges est  $f = \frac{2}{\lambda} \cdot \sin(\theta_i) = 1,5 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1}$  avec  $\lambda = 625 \text{ nm}$  et  $\theta_i = 28^\circ$ . Ce qui donne une période d'environ  $0,7 \text{ }\mu\text{m}$ . Cette période est trop petite pour pouvoir être résolue par un détecteur classique. En effet, d'après le critère de Nyquist - Shannon, il faudrait au moins deux pixels pour résoudre une frange, c'est-à-dire des pixels de  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$  de largeur. De plus, il faudrait 3 000 pixels pour détecter les différentes interfaces d'un échantillon sur une profondeur d'1 mm. C'est pourquoi un réseau de diffraction en transmission est placé sur l'axe z afin de diminuer la fréquence spatiale des franges.

En effet, en appliquant la formule de diffraction du réseau :

$$n_2 \sin(r) = n_1 \sin(i) - m \frac{\lambda}{\Lambda} \quad (50)$$

Avec  $n_1$  et  $n_2$  les indices des milieux respectivement avant et après le réseau,  $i$  l'angle d'incidence,  $r$  l'angle de diffraction,  $m$  l'ordre de diffraction et  $\Lambda$  le pas du réseau, ou encore dans notre cas :

$$\sin(\theta_d) = \sin(\theta_i) - \frac{\lambda}{\Lambda} \quad (51)$$

Avec  $\theta_d$  l'angle de diffraction d'ordre 1.

On obtient après le réseau :

$$I(z) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} \cdot \left(\sin(\theta_i) - \frac{\lambda}{\Lambda}\right) z\right) \quad (52)$$

$$I(z) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(2\pi \left[\frac{2\sin(\theta_i)}{\lambda} - \frac{2}{\Lambda}\right] z\right) \quad (53)$$

L'équation 53 montre qu'après le réseau, la fréquence des franges est diminué de  $\frac{2}{\Lambda}$ .

Une lentille de grandissement  $\gamma = 3,6$  image le réseau sur la caméra et modifie également la fréquence des franges :

$$I(z) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(2\pi \left[\frac{2\sin(\theta_i)}{\lambda \cdot \gamma} - \frac{2}{\Lambda \cdot \gamma}\right] z\right) \quad (54)$$

La Figure 65 montre l'influence des différents éléments optiques sur la période des franges en fonction de l'angle d'incidence avec  $\Lambda = 1,7 \text{ }\mu\text{m}$  (600 traits/mm) et  $\gamma = 3,6$ . C'est grâce au réseau que la visualisation d'un A-scan en une acquisition est possible en permettant de visualiser les franges avec des angles d'incidence des faisceaux référence et échantillon de  $18^\circ$  à  $21^\circ$  (période franges supérieure à  $50 \text{ }\mu\text{m}$ ).



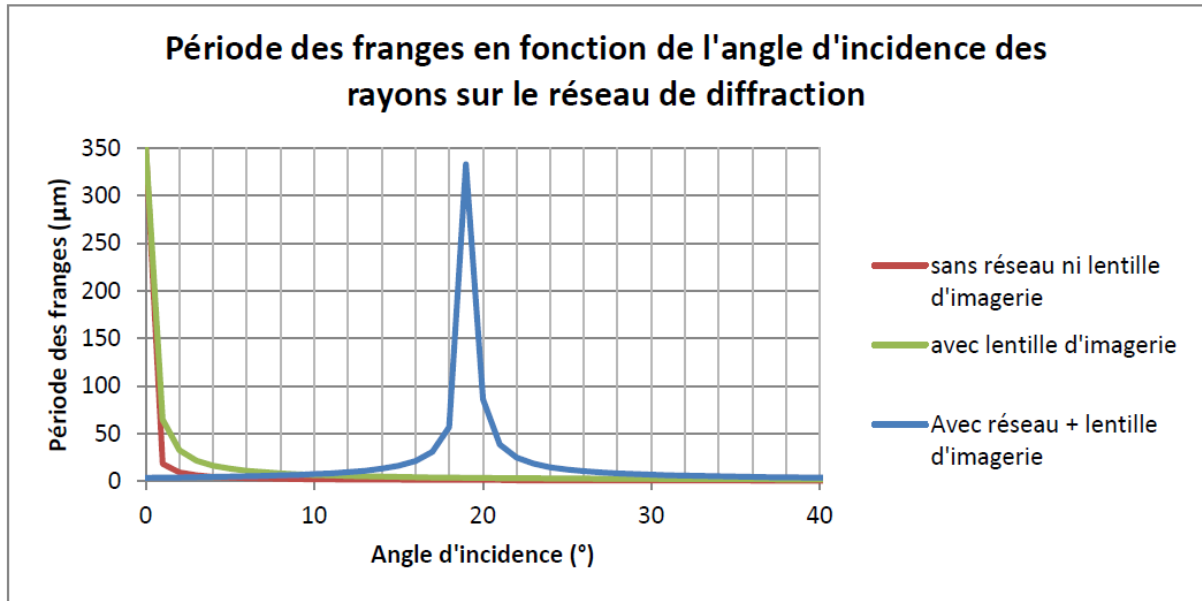


Figure 65 : Période des franges en fonction de l'angle d'incidence des rayons en configuration symétriques

Il est possible d'utiliser ce système en configuration asymétrique, c'est-à-dire que l'un des deux bras traverse le réseau de diffraction en incidence normale. Le signal enregistré par le détecteur devient :

$$I(z) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(2\pi \left[\frac{2\sin(\theta_i)}{\lambda \cdot \gamma} - \frac{1}{\Lambda \cdot \gamma}\right] z\right) \quad (55)$$

La Figure 66 montre la période des franges pour plusieurs configurations et montre son influence sur le dispositif expérimental en fonction du détecteur utilisé. Les deux détecteurs à disposition sont une caméra CCD matricielle monochrome uEye, codée sur 8 bits, composée de 1280 x 1024 pixels de taille 4,5 μm x 4,5 μm. D'après le théorème d'échantillonnage de Nyquist – Shannon, la période des franges doit être au minimum de 9 μm. En métrologie optique, il est conseillé de travailler avec une période de 18 μm (2 fois celle du critère de Nyquist – Shannon). L'autre détecteur est une caméra CCD linéaire monochrome AVIIVA, codée sur 12 bits, composée de 2048 pixels de taille 14 μm x 28 μm. Dans ce cas, la période des franges doit être au minimum de 56 μm.

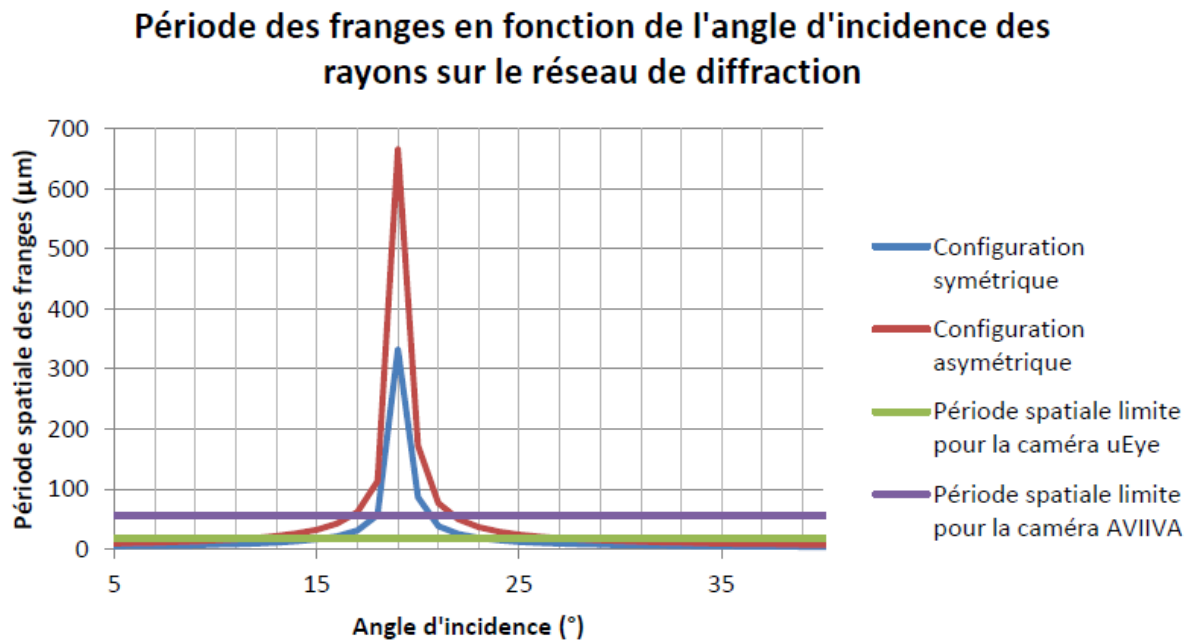


Figure 66 : Période des franges en fonction de l'angle d'incidence des rayons pour plusieurs configurations

Avec la caméra uEye, en configuration symétrique, l'angle d'incidence peut être compris entre  $16^\circ$  et  $23^\circ$  alors qu'en configuration asymétrique, l'angle est compris entre  $12^\circ$  et  $27^\circ$ . Avec la caméra AVIIVA, l'angle d'incidence doit être compris entre  $18^\circ$  et  $20^\circ$  en configuration symétrique et entre  $17^\circ$  et  $21^\circ$  en configuration asymétrique. Dans les deux cas, c'est avec un angle d'incidence de  $19^\circ$  que la période des franges est la plus grande.

#### 4.4. Traitement d'image en temps réel

Les interférences sur le réseau sont donc imagées sur une caméra CCD uEye avec  $1280 \times 1024$  pixels codés sur 8 bits et fonctionnant jusqu'à 20 images par seconde et avec des temps d'intégration allant jusqu'à 50 ms. Elle fonctionne en mode « binning x4 » sur l'axe vertical de l'image, c'est-à-dire qu'une moyenne est réalisée toutes les 4 lignes de l'image. L'image résultante est donc composée de  $1256 \times 256$  pixels. Cela permet d'améliorer la sensibilité au dépend de la résolution sur l'axe vertical de l'image qui ne présente aucun intérêt dans ce travail. L'image d'intercorrélation entre le faisceau référence et la réflexion d'un miroir (échantillon) issue de la caméra est présentée dans la Figure 67.

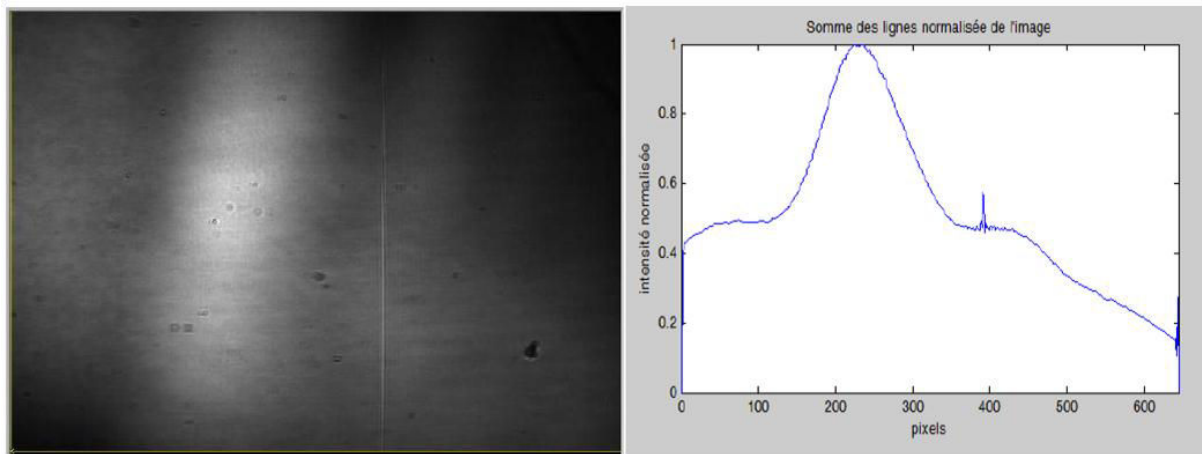


Figure 67 : image caméra et profil d'intensité

On observe sur toute l'image un fond continu et la figure d'interférence correspondant à l'intercorrélation entre le faisceau référence et la réflexion du miroir. Pour une meilleure visualisation, l'image est traitée. Une transformée de Fourier 1D (ligne par ligne) est réalisée à laquelle on applique un filtre passe bande (Figure 68) afin de sélectionner les fréquences correspondantes à la figure d'interférences et améliorer le rapport signal à bruit.

En effet si on a un signal modulé  $e(t) \cdot \cos(2\pi\nu_0 t)$ . Sa transformée de Fourier s'écrit :  $E(\nu) \otimes \frac{1}{2} \cdot (\delta(\nu - \nu_0) + \delta(\nu + \nu_0))$ . Si l'on ne filtre que la partie positive des fréquences et que nous prenons la transformée de Fourier inverse nous obtenons :  $e(t) \cdot e^{i2\pi\nu_0 t}$  et enfin en prenant le module de cette expression nous obtenons  $e(t)$  qui est l'enveloppe du signal modulé. Au lieu de sélectionner un demi-espace de fréquence, deux filtres passe bande de même largeur sont appliqués pour sélectionner aussi la partie négative.

Ils permettent aussi l'amélioration du rapport signal à bruit en supprimant tous les bruits non contenus dans la bande passante du signal interférométrique (hétérodynage spatial).

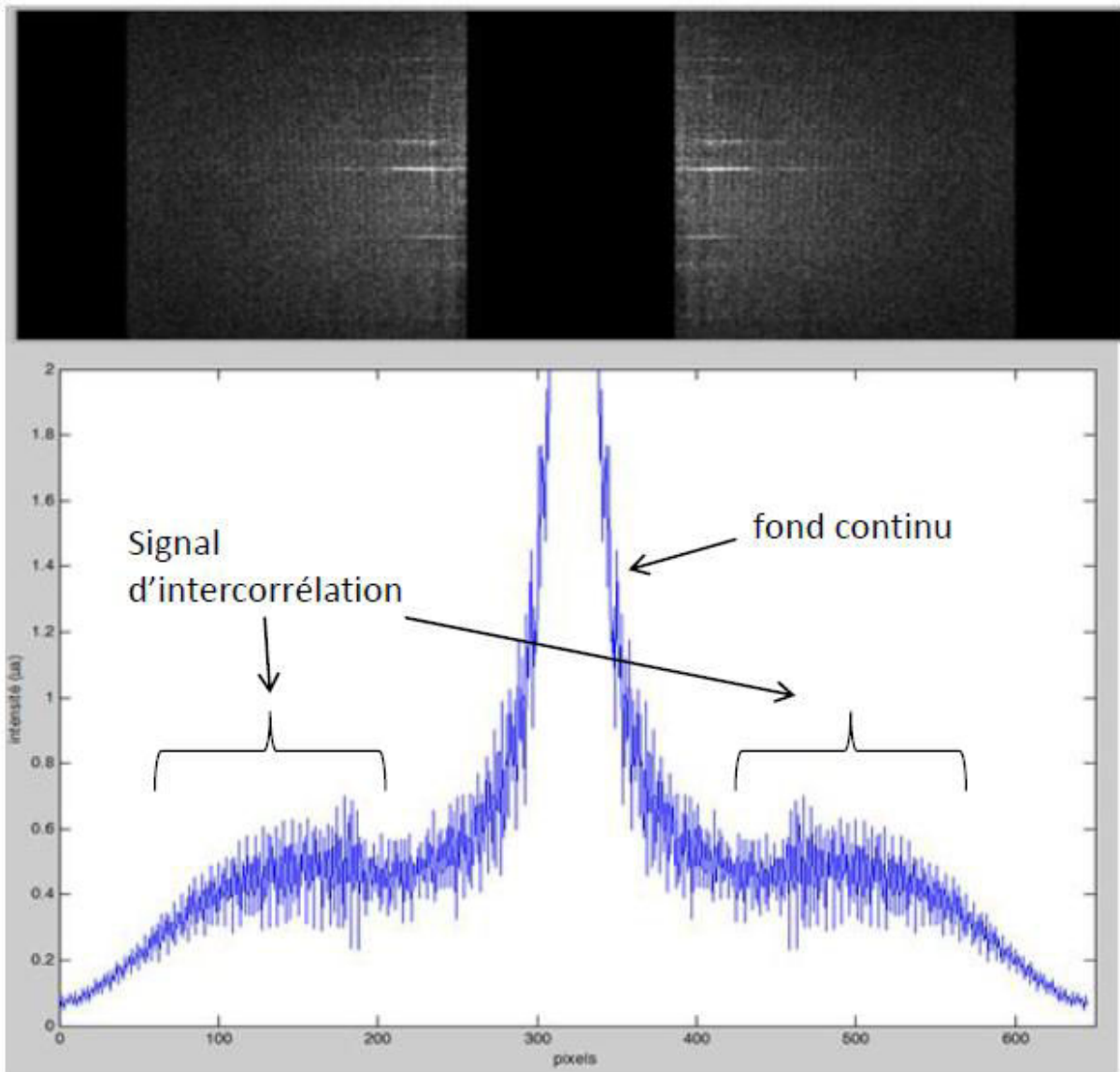


Figure 68 : Application de filtres sur la Transformée de Fourier de l'image caméra

En appliquant la valeur absolue pour chaque pixel, on obtient une image comme présentée dans la Figure 69 en temps réel :

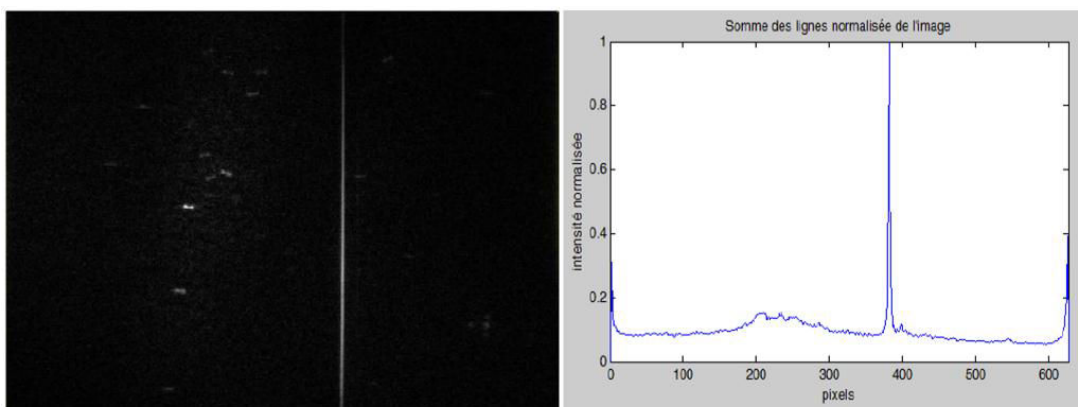


Figure 69 : Image en temps réel filtrée et son profil d'intensité normalisé obtenu en sommant les niveaux de gris colonne par colonne

Voici l'exemple d'un B-scan :

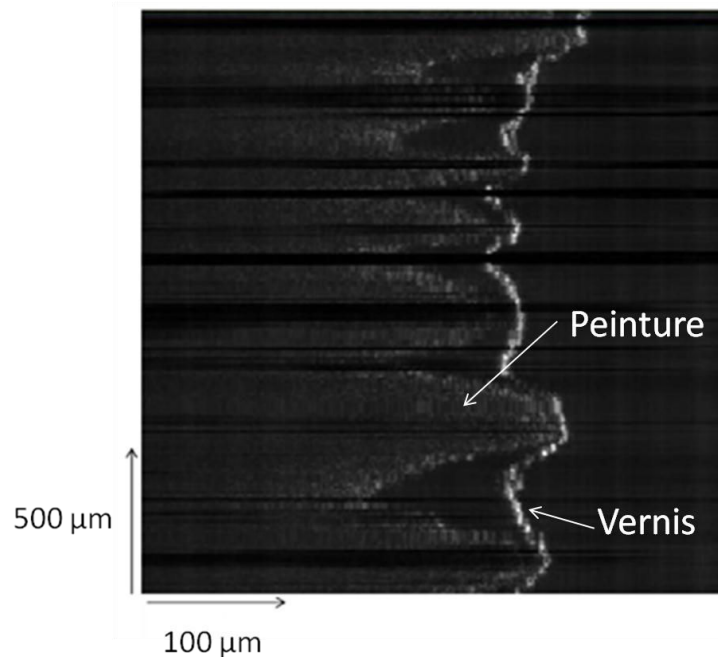


Figure 70 : Image d'une couche de peinture avec son vernis

La Figure 70 montre un B-scan d'un échantillon en carton sur lequel ont été appliquées une couche de peinture et de vernis. Chaque ligne de l'image représente la moyenne des lignes d'un A-scan. L'acquisition de l'ensemble des A-scans et l'affichage du B-scan sont synchronisés avec la vitesse de déplacement d'une platine motorisée sur laquelle est fixé l'échantillon.

La Figure 71 est un A-scan représentant un échantillon composé de lamelles en verre disposées en « marches d'escalier » (voir Figure 76). Elle illustre un problème que l'on peut rencontrer avec des échantillons dispersifs comme les tissus biologiques. En effet, chaque longueur d'onde de la source traverse l'échantillon à une vitesse différente, c'est le phénomène de dispersion. Elle a pour effet d'élargir le pic d'autocorrélation (le pic à 1280  $\mu\text{m}$  est plus large que le pic à 0  $\mu\text{m}$ ) ce qui signifie une dégradation de la résolution axiale.

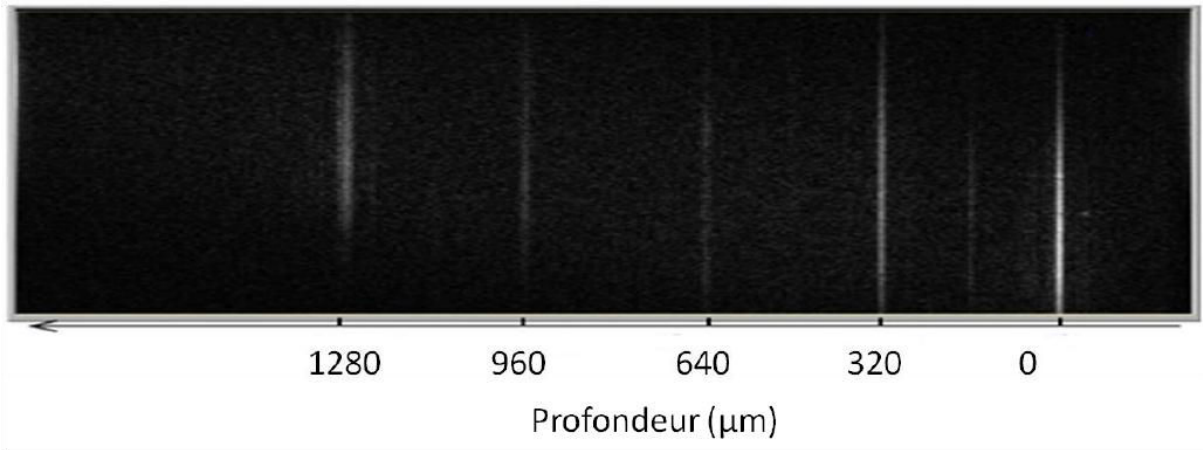


Figure 71 : Image A-scan d'un empilement de lamelle de verre

Dans cette image, on observe plusieurs figures d'interférences. Elle illustre bien le fait qu'une source supercontinuum, grâce à sa largeur spectrale, permet d'avoir une bonne résolution axiale mais aussi l'apparition du phénomène de dispersion en fonction de la profondeur de pénétration dans l'échantillon.

## 5. Dispersion

En OCT, la résolution axiale est intrinsèquement déterminée par la largeur de bande spectrale de la source lumineuse suivant la relation classique de Fourier-Heisenberg  $\Delta d \cdot \Delta \nu = c$ . Cela signifie qu'une bonne résolution axiale est atteinte avec une large bande spectrale. Par contre une largeur de bande spectrale importante produit une dispersion induite par l'échantillon (Figure 72). Cela entraîne un élargissement de la tâche d'Airy axiale ou réponse percutonnelle PSF (pour Point Spread Function).

En effet, si un faisceau lumineux de largeur de bande spectrale s'étendant de 550 nm à 700 nm traverse une épaisseur  $d$  de verre (N-BK7) de 10 mm, l'écart temporel maximal entre les longueurs d'onde est de :

$$\Delta t = \frac{d}{v_{550nm}} - \frac{d}{v_{700nm}} \quad (56)$$

Avec  $v_{550,700} = \frac{c}{n_{550,700}}$ ,  $c$  la vitesse de la lumière dans le vide et  $n$  l'indice de réfraction. Ce dernier est déterminé en utilisant les coefficients de Sellmeier [103] :

$$n^2(\lambda) - 1 = \frac{B_1 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 \cdot C_1} + \frac{B_2 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3 \cdot \lambda^2}{\lambda^2 - C_3} \quad (57)$$

Avec pour le verre N-BK7,  $B_1 = 1,03961212$  ;  $B_2 = 0,231792344$  ;  $B_3 = 1,01046945$  ;  $C_1 = 0,00600069867$  ;  $C_2 = 0,0200179144$  et  $C_3 = 103,560653$ .

L'écart temporel  $\Delta t$  est de 181,3 fs ce qui correspond à une différence de chemin optique de 36  $\mu\text{m}$ .

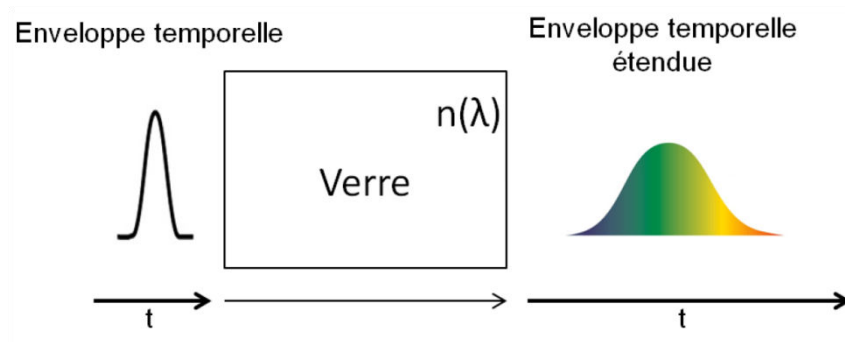


Figure 72 : Dispersion de la lumière traversant du verre

Cet effet a été étudié en OCT il y a plus de dix ans [77] et des techniques numériques ont été proposées pour compenser partiellement cette dispersion. Les deux grandes catégories de méthode de compensation de dispersion sont : matérielles (compensation en temps réel) ou logicielles (post-traitement). Les compensations numériques ont montré leur efficacité pour de l'imagerie de rétines pour des phénomènes de dispersion d'ordre deux (dispersion de vitesse de groupe) et trois comme la coma (Figure 73) [83].

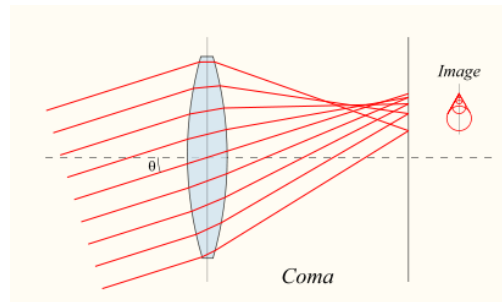


Figure 73 : Aberration géométrique, la coma  
[[http://fr.wikipedia.org/wiki/Aberration\\_géométrique](http://fr.wikipedia.org/wiki/Aberration_géométrique)]

Ce type de méthode nécessite du post-traitement relativement important. Les méthodes de compensation matérielle sont principalement indépendantes de la profondeur. La procédure principale est l'ajout dans le bras de référence de l'interféromètre d'un milieu donnant au faisceau qui le traverse une dispersion moyenne similaire à celle induite par l'échantillon [104]. Dans les systèmes OCT dans le domaine temporel, plusieurs systèmes de compensation dépendante de la profondeur ont été proposés il y a une dizaine d'années [105]. Ils sont basés sur des lignes à retard dans le domaine des fréquences. Ces systèmes utilisent les propriétés de dispersion déjà connues dans la compression d'impulsion. Ils ajoutent une dispersion qui évolue linéairement suivant la position du scan dans la profondeur. Nous allons montrer théoriquement et expérimentalement la possibilité de tirer avantage des propriétés des réseaux de diffraction dans la ligne à retard statique de notre système pour obtenir une compensation de la dispersion dépendante de la profondeur. Ce travail a fait l'objet d'une publication invitée [106].

Le système utilisé est quasi identique à celui présenté dans la Figure 60. La différence est que le faisceau issu du bras échantillon arrive sur le réseau en incidence normale (Figure 74).

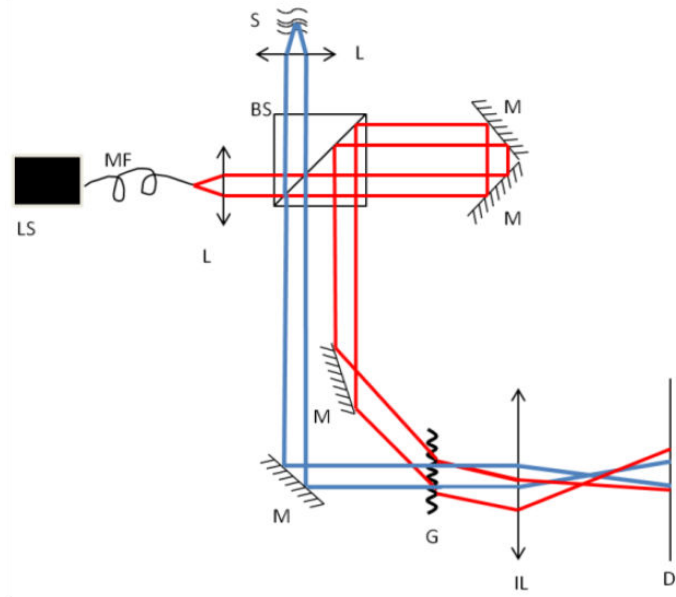


Figure 74 : Système Scan free OCT, S, échantillon ; L, lentille ; BS, cube séparateur ; M, miroir ; G, réseau de diffraction ; IL, lentille imagerie ; D, détecteur ; LS, laser supercontinuum ; MF, fibre multimode

L'intensité sur le détecteur, pour une composante spectrale de la source, devient :

$$I(z) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda\gamma} \cdot \sin(\theta_i) \cdot z - \frac{2\pi}{\lambda\gamma} \cdot z\right) \quad (58)$$

La possibilité de compenser les termes du second et troisième ordre de dispersion est basée sur les aberrations de front d'onde. L'expression du terme de phase  $\phi$  en fonction du defocus du plan image d'une distance  $d$  du plan du réseau s'exprime ainsi (Figure 75a) [99], [106]:

$$\phi(z, d) = \left(\frac{2\pi}{\lambda} \sin(\theta_i) - \frac{2\pi}{\lambda}\right) z + \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \left[ \sqrt{1 - \left(-\frac{\lambda}{\lambda} + \sin(\theta_i)\right)^2} - \cos(\theta_i) \right] \cdot d \quad (59)$$

Le second terme est non linéaire avec la fréquence de la lumière mais linéaire avec  $d$ . Un développement limité montre que le terme de dispersion d'ordre deux est prépondérant. Le defocus permet donc de générer une dispersion principalement d'ordre deux égale et opposée à celle induite par l'échantillon.

Si le réseau est incliné d'un angle  $\alpha$  par rapport au plan image  $P$  (Figure 75b), la distance  $d$  devient variable suivant la dimension  $z$  tel que  $d = z \cdot \tan(\alpha)$ .



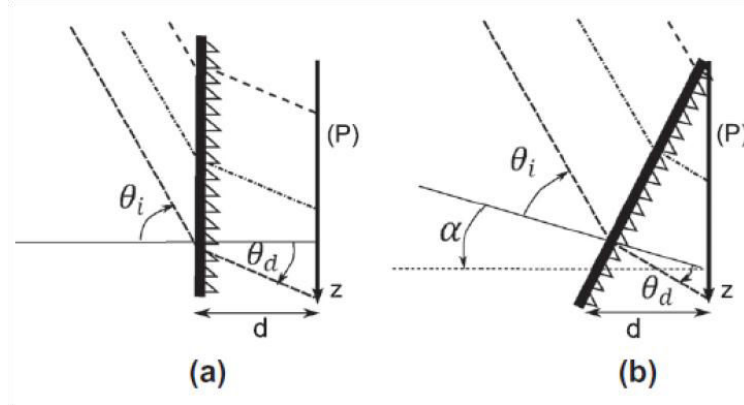


Figure 75 : Paramètres pour le calcul de dispersion : (a) Compensation de la dispersion moyenne, (b) compensation de la dispersion dépendante de la profondeur [106]

Le terme de dispersion varie linéairement suivant l'axe  $z$  et s'exprime ainsi :

$$\phi(z) = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \left[ \sqrt{1 - \left( -\frac{\lambda}{\lambda} + \sin(\theta_i) \right)^2} - \cos(\theta_i) \right] \cdot z \cdot \tan(\alpha) \quad (60)$$

Pour démontrer cela expérimentalement, nous avons généré une forte dispersion avec un empilement partiel de huit lamelles de microscopes insérées dans le bras échantillon juste avant le réseau. Nous sommes donc dans une configuration avec un seul passage dans un échantillon d'épaisseur variant de 160  $\mu\text{m}$  à 1,28 mm avec un indice de réfraction de 1,5 (Figure 76). La dispersion totale induite par l'échantillon est celle pour une différence de chemin optique de  $(n - 1) \cdot e$  avec  $n = 1,5$  et  $e$  l'épaisseur de l'échantillon. C'est comme si nous avions un échantillon avec une dispersion deux fois plus importante avec une épaisseur de 320  $\mu\text{m}$ .

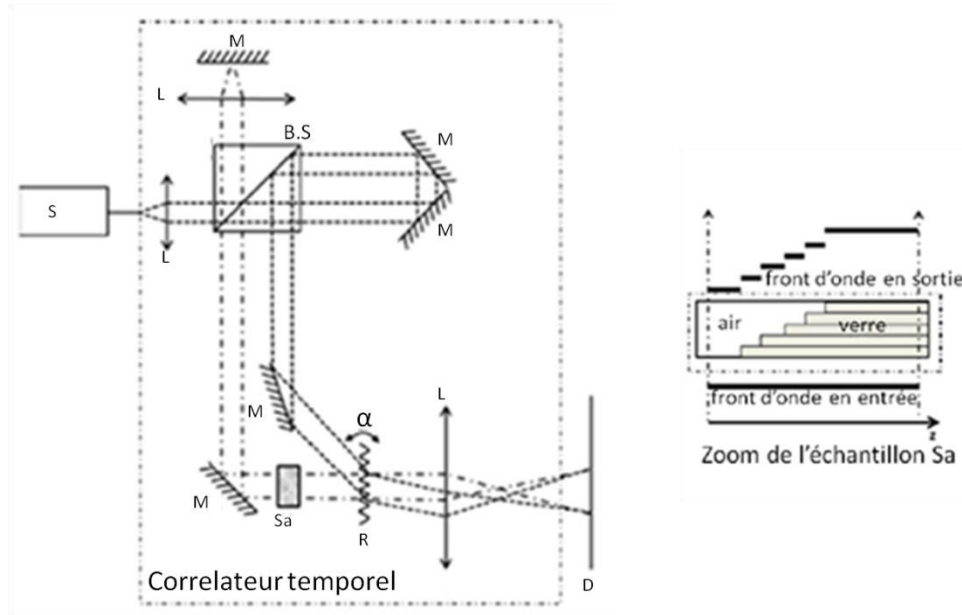


Figure 76 : Scan free OCT avec un échantillon en transmission [106]

Les Figure 77a et Figure 77b montrent, respectivement, un A-scan obtenu sans compensation de dispersion et avec compensation de dispersion dépendante de la profondeur (avec une inclinaison du réseau de  $16,26^\circ$ ).

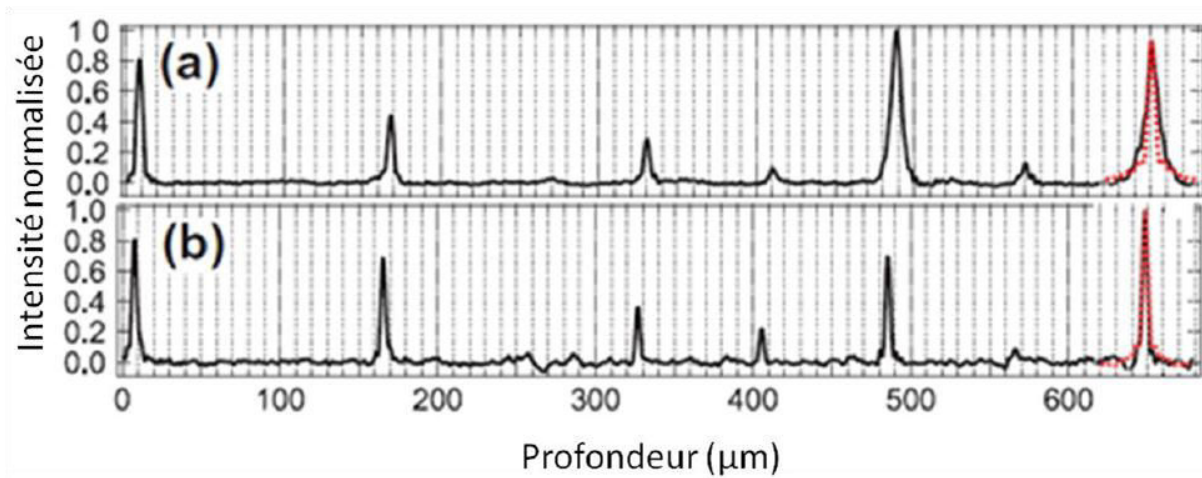


Figure 77 : Compensation de la dispersion dépendante de la profondeur en temps réel : (a) A-scan sans compensation de dispersion, (b) avec la compensation de dispersion dépendante de la profondeur. En pointillés, les pics d'autocorrélation théorique de la source

Les différents pics correspondent aux différentes distances optiques parcourues par le front d'onde le long de l'axe  $z$ . L'effet de la compensation de dispersion dépendante de la profondeur apparaît clairement sur la Figure 77b où la largeur des pics est constante sur toute la profondeur.

Pour connaître les limites de cette technique, il est nécessaire de comparer ces résultats avec la théorie et l'équation 60. Elle nous permet de déterminer l'angle  $\alpha$  nécessaire pour compenser la dispersion de l'échantillon. Cet angle est obtenu en connaissant la distance  $d$  (defocus) nécessaire pour parvenir à une compensation de dispersion sur toute la profondeur de l'échantillon et en connaissant la dimension du spot laser sur le réseau de diffraction. Cette distance est calculée de manière à avoir une dispersion résiduelle la plus petite possible (inférieure à la largeur à mi-hauteur de la trace d'autocorrélation). Pour notre expérience, avec une largeur de bande spectrale de 150 nm, une longueur d'onde centrale de 625 nm et un angle d'incidence sur le réseau de  $28^\circ$ , l'angle d'inclinaison du réseau est de  $16,7^\circ$ . C'est un angle relativement important qui a pour effet de diminuer l'efficacité de diffraction du réseau et nécessite un réalignement entre le faisceau référence diffracté et le faisceau échantillon. Il est possible d'incliner le détecteur en tenant compte du grandissement de la lentille d'imagerie. Cependant, dans ce cas, une grande inclinaison induit un vignettage sur le détecteur. C'est-à-dire qu'une partie du signal n'est plus imagée sur le détecteur ce qui signifie une perte d'information en profondeur. Notre lentille d'imagerie donne un grandissement de 3,6. L'inclinaison de la caméra doit donc être d'environ  $60^\circ$  ( $\approx 3,6.\alpha$ ) ce qui représente une perte importante d'informations. Expérimentalement, à la fois le réseau et le détecteur ont été inclinés pour minimiser ces effets indésirables. L'angle d'inclinaison du réseau équivalent mesuré est de  $16,26^\circ$  comme dit précédemment ce qui est proche de la valeur théorique. Cette différence est due aux erreurs de mesure de la taille du faisceau sur le réseau. Une erreur de

seulement 3% (30  $\mu\text{m}$  sur 1000  $\mu\text{m}$ ) compense cette différence et notre précision de mesure du spot est proche de 10%.

Pour une compensation moyenne, l'épaisseur maximale que le système peut compenser est de 11,30 mm pour un defocus  $d_{max} = 7,2 \text{ mm}$ . Pour une compensation de la dispersion dépendante de la profondeur, la distance  $d$  varie entre 0 et  $d_{max}$  le long du spot laser de diamètre  $D$ . L'angle d'inclinaison du réseau est  $\alpha = \tan^{-1} \left( \frac{d_{max}}{D} \right)$ . En pratique, si le diamètre du faisceau est de 3 mm et l'angle d'inclinaison du réseau de  $10^\circ$  alors il est possible de compenser la dispersion dépendante de la profondeur d'un échantillon de verre d'épaisseur 700  $\mu\text{m}$ .

## 6. Performances

### 6.1. Résolution axiale

La résolution axiale correspond à la largeur à mi-hauteur de la figure d'interférence d'autocorrélation de la source lumineuse.

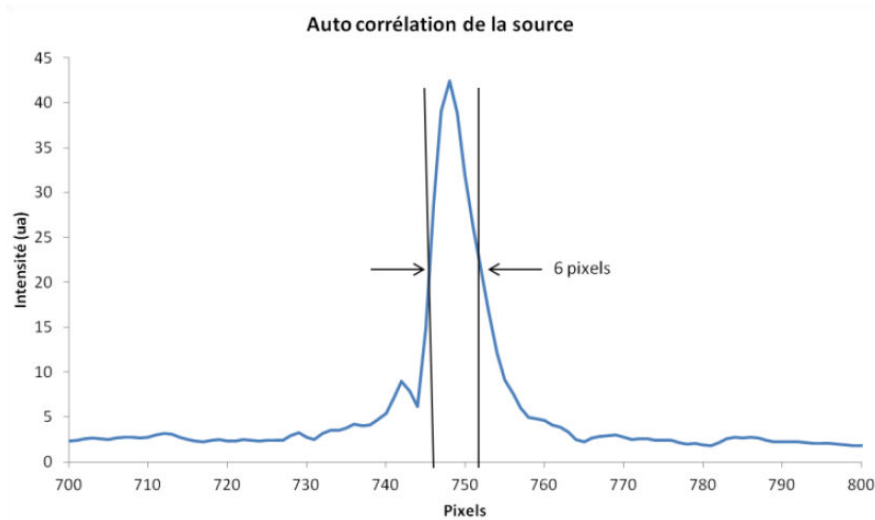


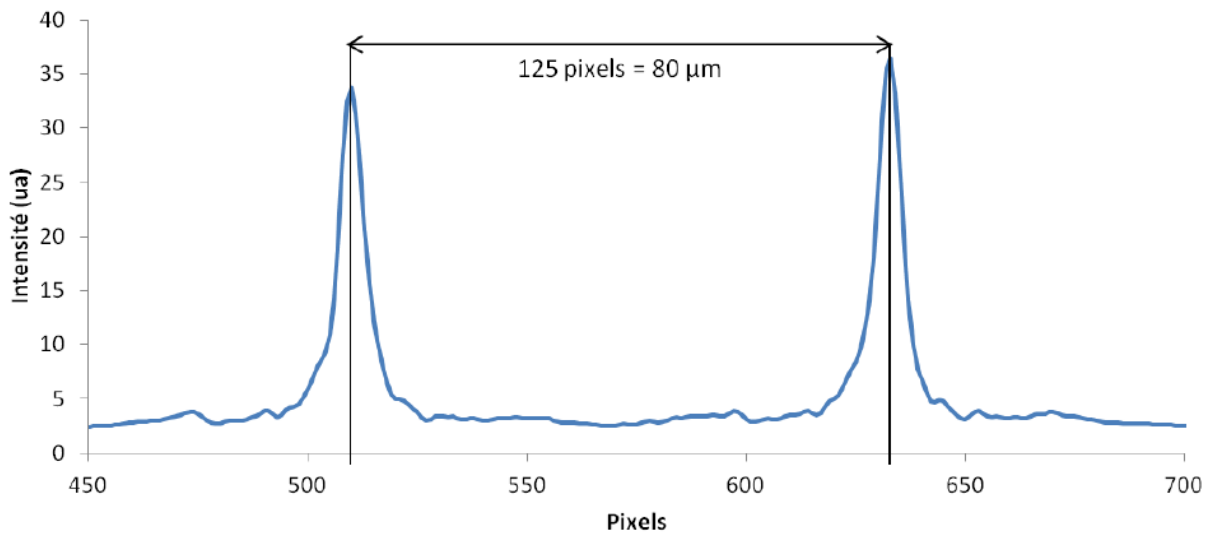
Figure 78 : Auto correlation de la source

Pour obtenir l'autocorrélation temporelle de la source, un miroir est placé à la place de l'échantillon dans la configuration de la Figure 74. La largeur du signal mesuré à l'aide de la caméra uEye est de quelques pixels (Figure 78). Pour l'obtenir en distance, il faut déterminer à quelle distance correspond un pixel. Pour cela, la méthode, préalablement étalonnée par une mesure équivalente de déplacement de la ligne à retard, consiste à disposer une lamelle de verre d'une épaisseur de 160  $\mu\text{m}$  dans un des bras en sortie du cube séparateur. Cela correspond à une augmentation de la distance optique  $d$  parcourue de :

$$d = (n - 1)e \quad (61)$$

Avec  $n$  l'indice du verre et  $e$  l'épaisseur de la lame. La dispersion induite par la lame est compensée. En ajoutant une lamelle de verre d'épaisseur 160  $\mu\text{m}$  et d'indice 1.5, la distance optique augmente de 80  $\mu\text{m}$  (Figure 79). La position du pic d'autocorrelation se décale sur la caméra de cette distance. En sauvegardant la première position de ce pic, on obtient deux pics séparés de 80  $\mu\text{m}$ .

**Traces de corrélation pour la mesure de la résolution axiale**



*Figure 79 : Traces de corrélation pour la mesure de la résolution axiale*

La distance entre les deux pics est de 125 pixels, ce qui signifie qu'un pixel équivaut à 0,64  $\mu\text{m}$ . La largeur à mi-hauteur du pic d'autocorrelation est de 6 pixels. La résolution axiale est donc de 3,8  $\mu\text{m}$  dans l'air. Dans un échantillon d'indice de réfraction  $n$ , la résolution axiale est de :

$$\Delta z = \frac{3,8}{2 \cdot n} \quad (62)$$

Un tissu biologique a un indice de réfraction en moyenne de 1,4.  $2 \cdot n$  correspond au fait que le faisceau traverse 2 fois l'échantillon. La résolution axiale est donc de 1,4  $\mu\text{m}$  dans les tissus biologiques.

## 6.2. Sensibilité

La sensibilité est définie comme étant la plus faible réflexion détectable par le système. L'équation 23 montre qu'elle dépend du rendement quantique du détecteur, de la puissance optique appliquée sur l'échantillon, du temps d'intégration du détecteur et de la longueur d'onde de la lumière utilisée. Cela équivaut à dire que la sensibilité dépend de la capacité maximale de charges que peut générer le détecteur (FWC pour Full Well Capacity). Cette FWC peut être remplie soit en augmentant la puissance envoyée dans le bras référence soit en

augmentant le temps d'intégration, l'objectif étant d'atteindre la limite de saturation du détecteur. Le détecteur est alors limité par le bruit de grenaille.

La sensibilité peut donc aussi s'écrire [96] :

$$S = 10. \log \left( \frac{FWC}{2} \right) \quad (63)$$

Pour la caméra uEye, la FWC est de 12 000 électrons. La sensibilité pour chaque pixel est donc de 37,8 dB. Pour augmenter cette sensibilité, une moyenne est réalisée entre toutes les lignes du capteur. La sensibilité devient égale à 67,9 dB.

Une autre façon d'augmenter la sensibilité serait de moyenner le signal sur 2 pixels dans l'axe de la profondeur de l'échantillon. Dans ce cas, la sensibilité est augmentée de 3 dB mais au dépend de la profondeur accessible. Il serait aussi possible de moyenner plusieurs acquisitions d'une même mesure. Ainsi, en réalisant 17 images d'un même point de l'échantillon, la sensibilité atteint 80 dB. L'inconvénient est l'augmentation du temps de mesure. Cela représente dans le meilleur des cas pour cette caméra uEye un temps de mesure par point de 17 ms.

Expérimentalement, la sensibilité est mesurée sur une image avec une intensité optique dans le bras référence telle que la détection est en limite de saturation. La détection est ainsi limitée par le bruit de grenaille. L'intensité du bras échantillon est au contraire atténuée au maximum avec une Densité Optique neutre (DO) de manière à avoir un signal d'interférence faible simulant une faible réflexion. L'atténuation de la DO est de 40 dB.

La sensibilité  $S$  est donnée comme étant :

$$S = 20. \log \left( \frac{A_s}{A_b} \right) + 40 \quad (64)$$

Avec  $A_s$  l'amplitude du signal fortement atténué,  $A_b$  l'amplitude du bruit. 40 correspond à l'atténuation du faisceau échantillon par la densité optique (Figure 80).

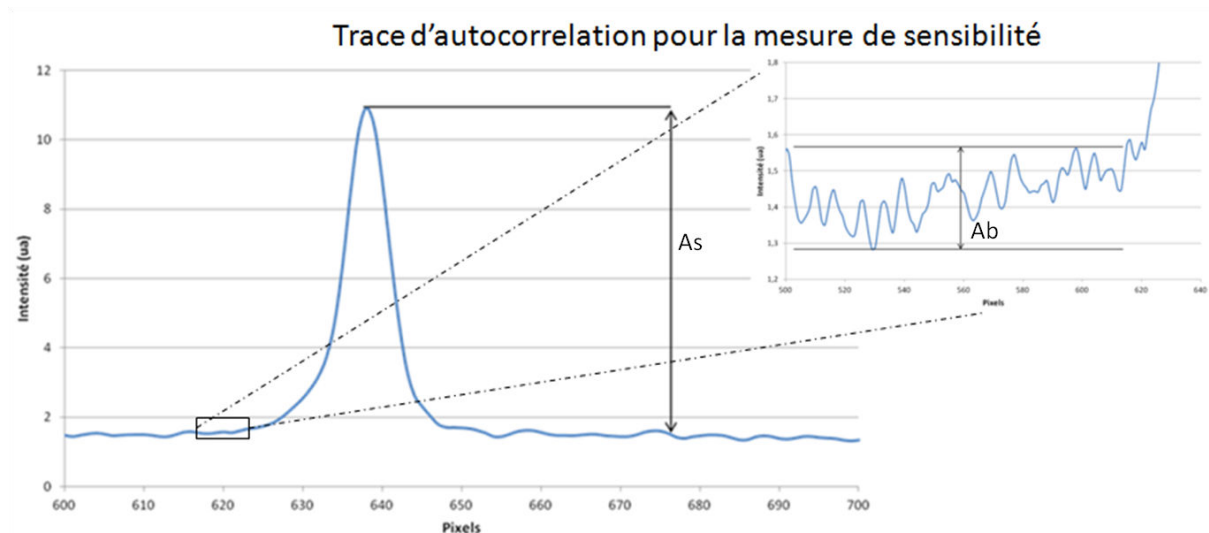


Figure 80 : Mesures de l'amplitude et du bruit du signal d'autocorrélation

La sensibilité mesurée est de 60 dB. La différence entre ce résultat et la valeur théorique est due aux pertes de puissance dans le système. Les pertes mesurées sont de 7,5 dB dont 3 dB proviennent du cube séparateur.

Pour la caméra AViiVA, la FWC est de 312 500 électrons. Ce qui donne une sensibilité de 52 dB. Le meilleur moyen d'augmenter la sensibilité avec cette caméra est de réaliser un grand nombre d'acquisition d'images. En effet son temps d'intégration minimale est de 14,3  $\mu$ s. Pour atteindre les 80 dB de sensibilité, il faut réaliser 640 acquisitions, ce qui représente un temps de mesure d'environ 9 ms. Ce temps de mesure peut être divisé par 2 si le signal est moyenné sur 2 pixels de la caméra. Cette caméra est préférable à la précédente car elle permet à la fois d'augmenter la sensibilité et la vitesse d'acquisition.

### 6.3. Résolution latérale

D'après les données du fournisseur, la lentille télécentrique utilisée dans notre système donne un diamètre du point focal de 9,9  $\mu$ m. Pour mesurer ce diamètre expérimentalement, deux méthodes ont été utilisées. Pour la première, une cible USAF 1951 est utilisée comme échantillon (Figure 81).

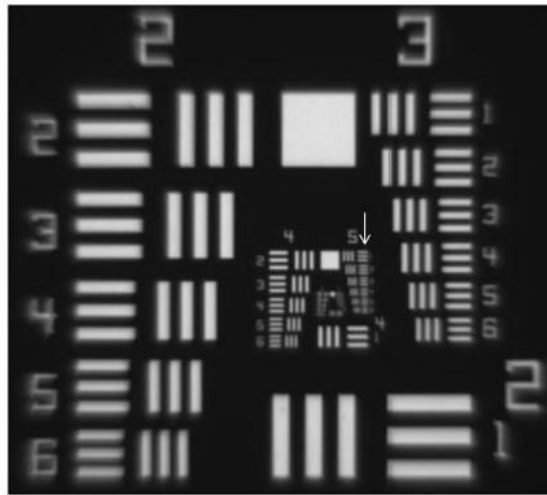


Figure 81 : Cible USAF 1951 : la flèche indique la colonne utilisée pour les mesures

L'objectif est de balayer le groupe 5 qui correspond à des tailles de trait de  $15,63 \mu\text{m}$  à  $8,77 \mu\text{m}$ . La Figure 82 montre le profil d'intensité et l'image correspondante.

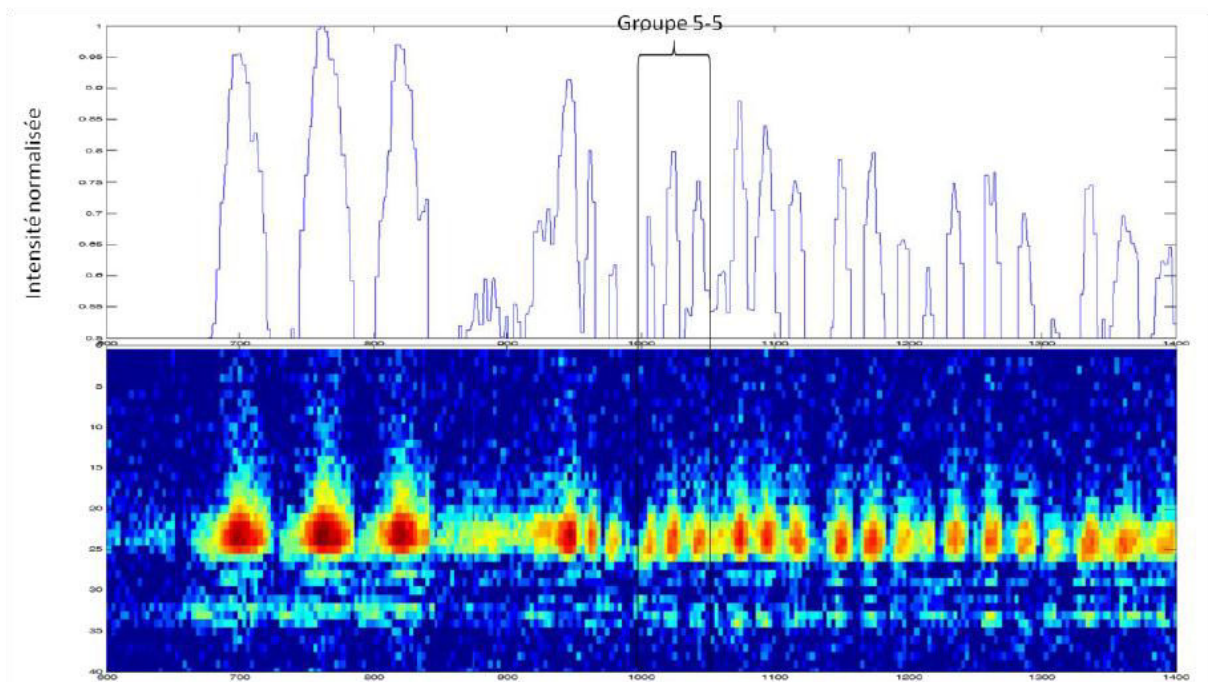


Figure 82 : Profil d'intensité correspondant au groupe 5 de la mire USAF 1951 et l'image correspondante.

Le système est capable de résoudre les traits du groupe 5-5 qui correspond à 50,8 cycles par millimètre soit une largeur de trait de  $9,84 \mu\text{m}$ .

La deuxième méthode est la méthode du couteau. Le principe consiste à déplacer le spot laser en direction d'un trait de la mire avec une largeur plus importante que le diamètre du spot comme le montre la Figure 83. Pour chaque position du spot, l'intensité lumineuse réfléchie par la mire est mesurée. Chaque mesure correspond à un déplacement de faisceau de  $1 \mu\text{m}$ .



La Figure 84 montre les résultats de mesure avec la courbe de tendance d'ordre 6 donnant l'équation de la courbe suivante :

$$y = 6.10^{-6}.x^6 - 2,5.10^{-3}.x^5 + 4,5.10^{-1}.x^4 - 43,4.x^3 + 2\,320,8.x^2 - 65\,403.x + 758\,199$$

Avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,9978$

La Figure 85 montre la dérivée du signal enregistré comparée à une courbe gaussienne théorique se rapprochant au mieux de la fonction dérivée. La fonction théorique est de la forme :

$$g = A.e^{\frac{(x+m)^2}{2.\sigma^2}} \quad (65)$$

Avec  $A$  l'amplitude maximale,  $m$  la valeur centrale en abscisse,  $\sigma$  l'écart type. L'équation de la gaussienne se rapprochant au mieux de la dérivée est alors :

$$g = 0,94.e^{-\frac{(x+0,2)^2}{40}} \quad (66)$$

L'écart type de la fonction est égale à  $\sigma \approx 4,47$

La largeur à mi-hauteur des fonctions gaussiennes  $H$  vaut :

$$H = 2\sqrt{2.\ln(2)}. \sigma \quad (67)$$

Dans notre expérience, la largeur du spot lumineux est d'environ  $10,5 \mu\text{m}$ .

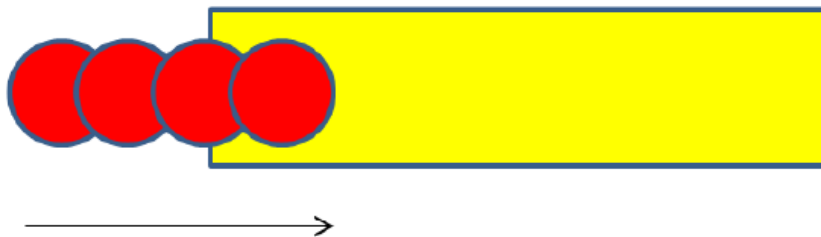


Figure 83 : déplacement du spot en direction du trait de la mire



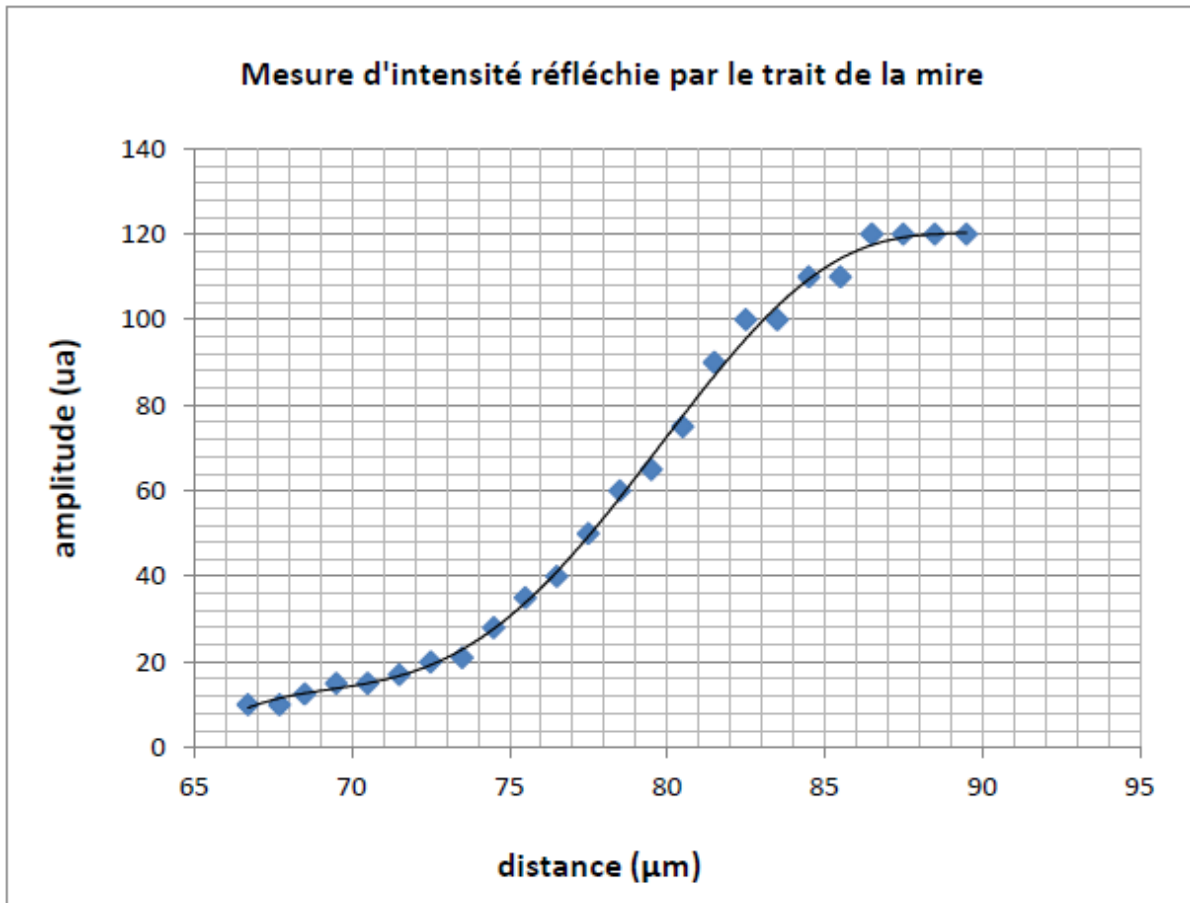


Figure 84 : Mesure d'intensité réfléchiée par le trait de la mire (en losange bleu) et une courbe de tendance (en trait plein noir)

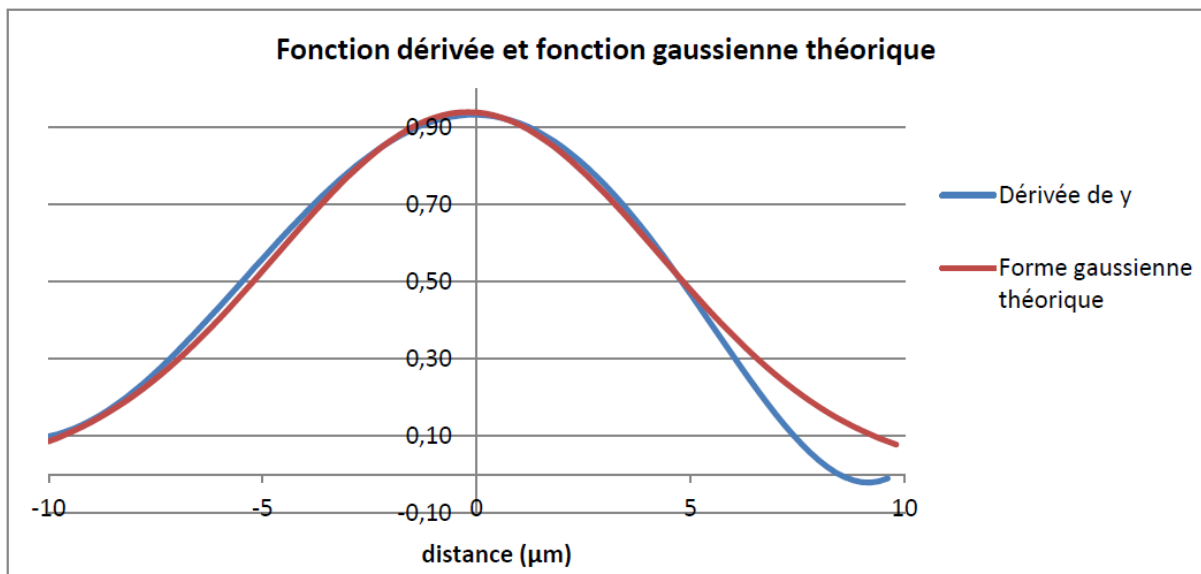


Figure 85 : Dérivée du signal mesuré et fonction gaussienne se rapprochant de la dérivée

#### 6.4. Profondeur d'imagerie

La profondeur d'imagerie, c'est-à-dire la profondeur maximale dans l'échantillon que le système OCT peut imager, dépend de plusieurs paramètres :

- La lentille de focalisation : appelée distance de Rayleigh ou paramètre confocal, cette distance est celle pour laquelle le diamètre du faisceau est compris entre  $\omega_0$  et  $\sqrt{2}\omega_0$ . Elle est ici de 580  $\mu\text{m}$ .
- La taille de la zone de superposition des deux faisceaux sur le réseau : en effet nous avons vu dans la partie précédente que le retard optique lié à la profondeur dans l'échantillon s'exprime ainsi :

$$\tau = \frac{z \cdot \sin(\theta_i)}{c} \quad (68)$$

Il dépend de l'angle d'incidence des faisceaux  $\theta_i$ . Plus cet angle d'incidence est grand, plus la taille du faisceau sur le réseau est grande, plus le retard optique est important ce qui signifie qu'une plus grande profondeur de l'échantillon est visible. Cependant cet angle d'incidence influe également sur la fréquence des franges. L'angle limite est donc celui pour lequel la fréquence des franges devient trop grande pour le détecteur. Si l'angle d'incidence est de  $19^\circ$  et la taille du faisceau dans le système de 4 mm, alors la taille du spot sur le réseau est de 4,2 mm. Le retard temporel maximum détectable est de 4,6 ps. Cela correspond à une profondeur accessible dans un milieu d'indice de réfraction de 1,4 d'environ 490  $\mu\text{m}$ . Dans le cas où le système est en configuration asymétrique, cette profondeur est de 465  $\mu\text{m}$  car la taille du faisceau devient égale à 4 mm.

- La taille du détecteur : Pour un bon échantillonnage, la trace de corrélation est détectée par 4 pixels. Notre résolution dans un milieu d'indice 1,4 étant d'environ 1,5  $\mu\text{m}$ , la profondeur accessible avec un détecteur de 1280 pixels est de 480  $\mu\text{m}$ . Avec un détecteur de 2048 pixels, elle est de 768  $\mu\text{m}$ .

Une mesure expérimentale est réalisée en utilisant un miroir comme échantillon. Il est positionné afin d'avoir la trace de corrélation à un bord de l'image acquise à l'écran. Ensuite, il est déplacé à l'aide d'une platine motorisée d'une distance maximale correspondant à celle où la trace de corrélation se situe à l'autre bout de l'image acquise. La profondeur accessible par notre système est d'environ 420  $\mu\text{m}$ . La différence entre les données théoriques et la mesure expérimentale est due au fait que le spot sur le réseau n'est pas totalement imagé sur le détecteur.

#### 6.5. Vitesse d'acquisition

La vitesse d'acquisition est principalement limitée par le temps d'intégration du détecteur nécessaire pour une sensibilité suffisante. La caméra uEye est limitée à une vitesse d'acquisition de 20 images par seconde soit un temps d'intégration de 50 ms. La vitesse maximale est donc de 20 A-scans/s. Pour avoir une sensibilité de 80 dB, 17 acquisitions sont nécessaires, la vitesse d'acquisition pour une sensibilité de 80 dB est d'environ 1 A-scan/s.

Avec la caméra AViiVA, la vitesse d'acquisition maximale est de 70 000 A-scans/s. Cependant pour obtenir une sensibilité de 80 dB, il est nécessaire de réaliser 640 acquisitions d'un même point de mesure. La vitesse d'acquisition devient de 109 A-scans/s.

Le diamètre du spot laser sur l'échantillon est de 10  $\mu\text{m}$ . Pour un bon échantillonnage, chaque signal enregistré représente un déplacement de 2,5  $\mu\text{m}$ . Une vitesse de 109 A-scans/s représente un balayage sur l'échantillon d'environ 272  $\mu\text{m/s}$ .

## 6.6. Tests sur des échantillons biologiques

Nous avons voulu réaliser des images d'échantillons biologiques à partir de notre système mais il s'avère que la sensibilité actuelle est trop faible. Ceci est dû à un pourcentage de perte encore trop élevé. Afin d'essayer d'obtenir malgré tout des images sur un tissu biologique (corde vocale paraffinée) nous avons remonté un dispositif de FDOCT (Figure 86) conventionnel qui bénéficie comme expliqué précédemment d'un avantage en terme de sensibilité (avantage dit « de Fellgett »).

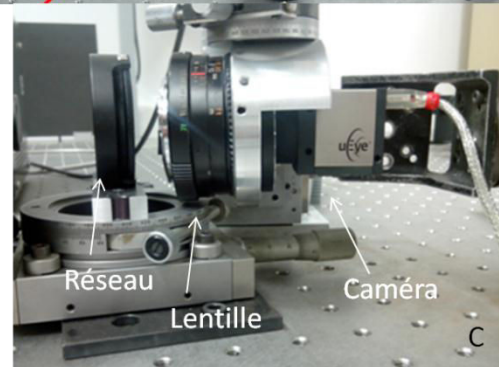
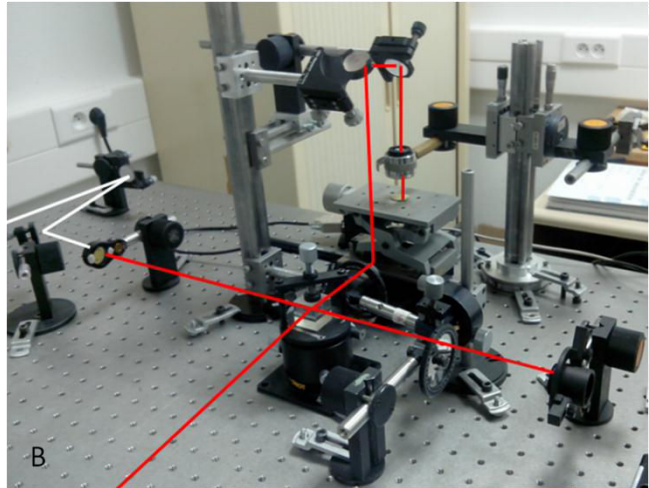
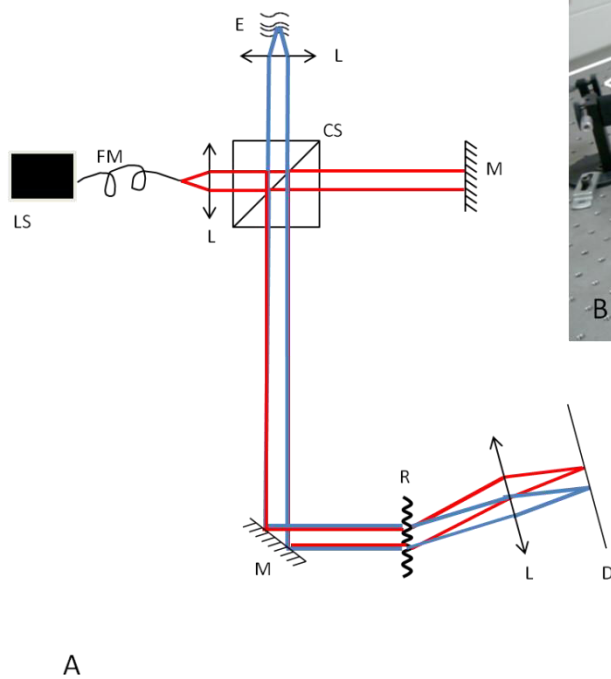
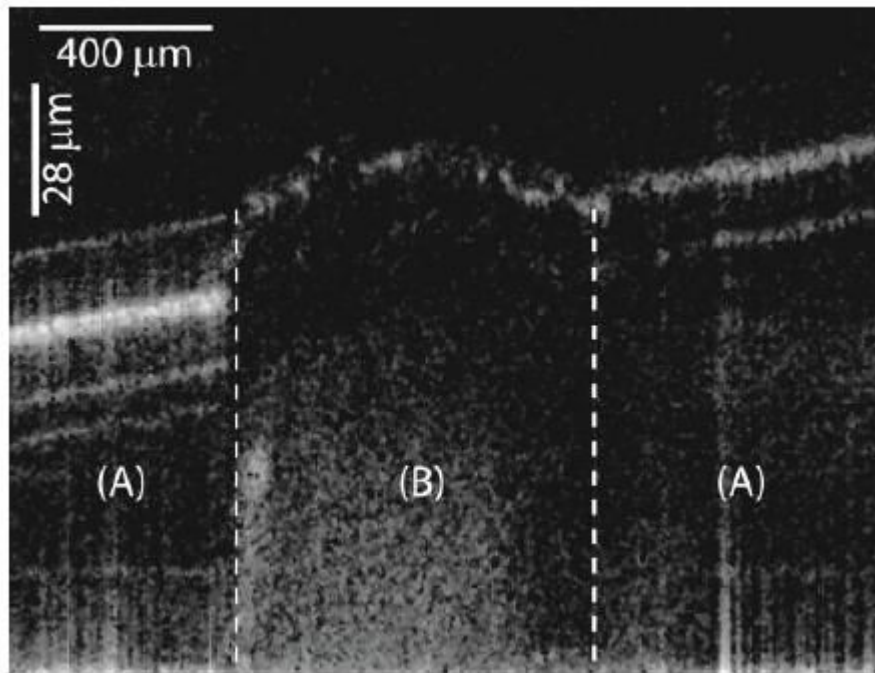


Figure 86 : Système FDOCT, (A) : Schéma, LS laser supercontinuum, FM fibre monomode, L Lentille, E Echantillon, CS Cube séparateur, M Miroir, R Réseau de diffraction, D Détecteur ; (B) : Photo de l'interféromètre ; (C) : Photo de l'ensemble détection

En effet, ce système utilise la même source filtrée avec une largeur de bande spectrale de 150 nm permettant de garder la même résolution axiale. La caméra uEye est placée au plan de Fourier de la lentille d'imagerie. Le signal est focalisé sur une ligne de 1280 pixels. Ainsi la sensibilité est proche des 90 dB. A la suite de cela nous avons imagé cette corde vocale. Ce résultat est celui présenté sur la Figure 87. Ce B-scan est l'assemblage de 200 A-scans.



*Figure 87 : B-scan de corde vocale paraffinée ; (A) zone du bloc de paraffine, (B) zone de la corde vocale*

La corde vocale est observée sur toute sa dimension transverse (environ 1mm) et sur une profondeur d'une centaine de micromètres (zone (B)). On différencie très nettement la zone du bloc de paraffine (A) par rapport à celle de la corde vocale. En revanche nous constatons que le signal provenant de l'intérieur de la corde vocale ne présente aucune structure décelable. Cela signifie qu'aucun contraste d'indice suffisant n'existe avec une sensibilité du système pourtant proche des 90dB. La Figure 88 obtenue sur une feuille d'orchidée prouve bien que ce système permet pourtant de détecter des structures tant du point de vue résolution latérale et axiale que du point de vue sensibilité.

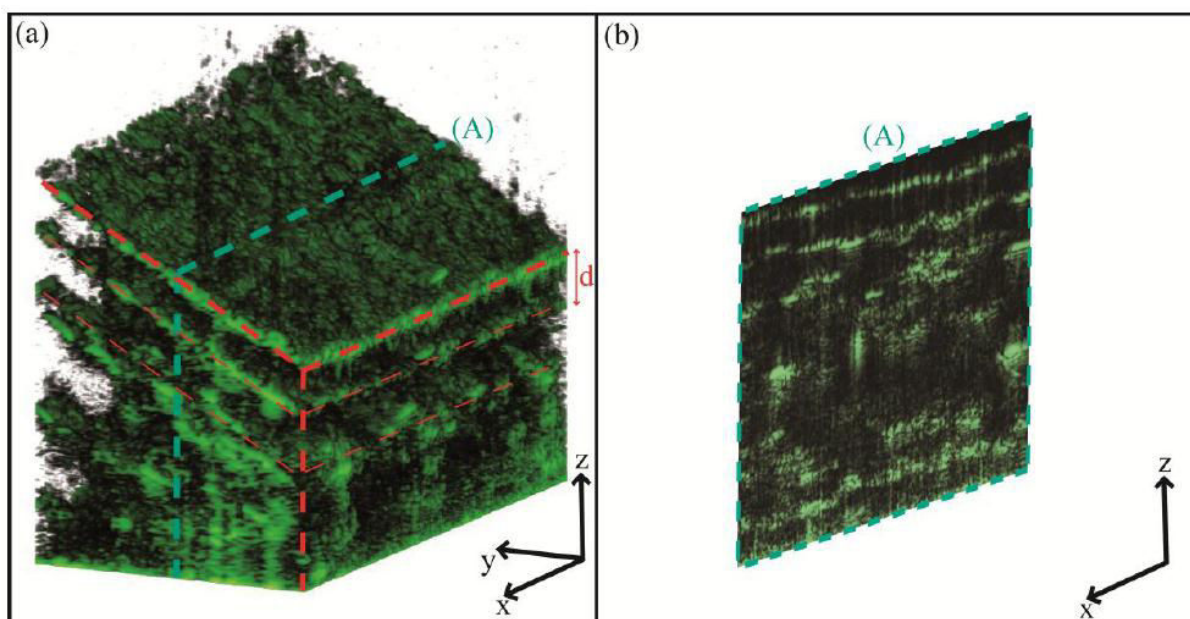


Figure 88 : Image tomographique d'une feuille d'Orchidée, les dimensions plein champ sont  $500\ \mu\text{m}$  en  $x$ ,  $250\ \mu\text{m}$  en  $y$  et  $270\ \mu\text{m}$  en  $z$ . (a) volume complet, (b) coupe du volume complet suivant le plan (A)

En effet sur l'image tomographique de l'orchidée les plans cellulaires sont clairement visibles et séparés d'une distance  $d$  de l'ordre de  $35\ \mu\text{m}$ . Une raison pour laquelle aucune structure n'est visible sur la corde vocale pourrait être que le 'traitement' de la corde vocale à la paraffine diminue les contrastes d'indice, la paraffine ayant pris la place de l'eau dans les tissus. Le même type d'effet a été observé sur une corde vocale dans un bain de formol pour des raisons probablement similaires. La seule solution serait donc de pouvoir faire des mesures sur des tissus frais ce qui dans l'état actuel des choses n'est pas envisageable pour des raisons essentiellement réglementaires (les biopsies ne sont pas disponibles de façon simple si les conditions de conservation, d'utilisation et le protocole de mesure n'ont pas démontré clairement leur 'innocuité' vis-à-vis de l'échantillon).

## 7. Conclusion

Le système OCT présent au laboratoire a été caractérisé et modifié afin de l'utiliser pour de l'imagerie de tissus biologiques. Ainsi, la source laser supercontinuum permet de travailler avec une largeur spectrale de 150 nm grâce à laquelle la résolution axiale est de 1  $\mu\text{m}$  dans les tissus biologiques. L'autre point fort de ce système est la capacité de compenser la dispersion du système et celle dépendante de la profondeur de l'échantillon optiquement. La dispersion d'ordre 2 et 3 est ainsi compensée sans post-traitement nécessitant bien souvent un temps de calcul conséquent.

L'utilisation d'une caméra rapide a permis d'augmenter la vitesse d'acquisition.

Comme tout système OCT dans le domaine temporel, le point faible est la faible sensibilité par rapport au système dans le domaine fréquentiel. Celle-ci peut encore être augmentée en choisissant une caméra avec une capacité de charge (FWC) plus importante et en utilisant une source laser plus puissante.

Quelques images sur des cordes vocales paraffinées ont pu être réalisées avec un système FD-OCT. Si la première face de l'échantillon est visible, aucune structure n'apparaît dans les couches inférieures. Cela peut être dû à la paraffine qui, remplaçant l'eau, diminue les contrastes d'indice.

## Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse a permis le développement d'un système fibré d'imagerie hyperspectrale utilisant plusieurs modalités en vue d'une aide au diagnostic et l'étude d'un système OCT hybride, possible modalité supplémentaire.

Les études bibliographiques ont consisté d'une part à déterminer les longueurs d'onde favorables à la mesure d'autofluorescence des tissus biologiques et à appréhender les éléments optiques nécessaires pour un montage relativement peu coûteux et compact (transportable). Elles ont permis d'autre part de réaliser un état de l'art des systèmes OCT afin de situer celui présent au laboratoire.

Les perspectives à court et moyen terme consistent à limiter les pertes du système fibré de fluorescence en adaptant les porte-filtres à des fibres avec des diamètres de cœur et des ouvertures numériques relativement importantes et de réaliser des mesures avec un spectromètre plus sensible.

Une partie des travaux a permis de développer un système entièrement fibré mesurant l'autofluorescence des tissus biologiques à trois longueurs d'onde d'excitation correspondant à l'absorption de fluorophores comme le collagène, l'élastine et le NADH. Une lampe halogène permet la mesure de spectre en réflectance diffuse pouvant apporter des données d'absorption sur des tissus *in vivo* comme celle de l'hémoglobine ou bien d'éventuellement corriger les spectres de fluorescence en prenant en compte l'absorption spectrale des tissus.

Une autre partie concerne le système OCT dans le domaine temporel sans balayage. Il est montré que les phénomènes de dispersion d'ordre deux et trois sont corrigés optiquement ceux qui permettent de limiter fortement le post-traitement. Le changement de détecteur a permis d'améliorer la vitesse d'acquisition d'un facteur 100.

Le point faible du système OCT et de tout système dans le domaine temporel est sa sensibilité. Celle-ci peut être augmentée avec un détecteur avec une capacité de charge par pixel maximale (FWC) plus importante. Il permettrait aussi pour une même sensibilité d'augmenter la vitesse d'acquisition.

Les perspectives à long terme seraient l'ajout d'autre modalité au système fibré comme une sonde Raman et le développement d'un système OCT inséré dans le système multimodal.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Optical Fiber Technology

www.elsevier.com/locate/yofte



### Invited Papers

## Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation

L. Froehly\*, J. Météau

Département d'Optique PM Duffieux, Institut FEMTO-ST, UMR CNRS 6174, Université de Franche-Comté, 25030 Besançon Cedex, France

### ARTICLE INFO

Article history:  
Available online xxxx

Keywords:  
Supercontinuum  
Optical coherence tomography  
Scan-free  
Grating correlation  
Optical dispersion compensation

### ABSTRACT

Supercontinuum generation and the development of light sources based on these effects are discussed. We especially emphasize on the use of such sources for optical coherence tomography imaging after a brief overview of OCT systems. Finally we demonstrate the use of a commercial supercontinuum in the frame of 'scan-free' time domain correlation and optically processed depth dependant dispersion Compensation.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Optical Coherence Tomography (OCT) is a non-invasive imaging technique that has attracted immense interest over the last decade, especially in the field of biomedical imaging [1,2]. With such performances OCT fills the gap between the high penetration depth of ultrasound imaging (a few centimeters but at the cost of a poor resolution) and confocal microscopy high resolution (the micrometer in all dimensions but with a lower penetration depth).

Axial resolution and depth penetration are connected to the light source used to illuminate the sample. Indeed in OCT the axial resolution is inversely proportional to the spectral bandwidth used whereas the penetration depth depends essentially on the central wavelength (sample scattering) and on the source brightness. It is then not surprising that supercontinuum light sources found, since their development a decade ago, a tremendous field of application in OCT. Indeed such light sources are combining both the advantage of an extremely broad bandwidth and of a high density of photon per spatio/temporal cell. In the first part of this paper we will give an overview of the main system principles in OCT. As a second part we will focus on the development of supercontinuum light sources for OCT with the added value of such light sources for the OCT community. Using broad bandwidth has also the counterpart of increasing the dispersion what directly leads to a dramatic loss of resolution. The last part of this paper is a research part in which we investigate what is already done to solve this problem and we will discuss and demonstrate an interesting property of a

'scan-free' time domain correlator which enables depth dependant dispersion compensation in real-time by optical processing.

### 2. OCT in general

#### 2.1. OCT performances-definitions

Before giving a short overview of OCT main principles we introduce some terms that are used to characterize the performances of these systems.

- Spatial resolution is the minimum size pattern we can distinguish laterally. The lateral resolution in OCT is the resolution of the microscope objective which illuminates the sample. This resolution  $\Delta x$  is given by

$$\Delta x = \frac{\alpha \lambda f}{d} \quad (1)$$

where  $\alpha$  is a constant dependant on the shape of the focused beam,  $\lambda$  is the beam central wavelength,  $f$  the objective lens focal length and  $d$  is the beam diameter on the objective lens.

- Axial resolution: The depth resolution is defined by the light beam coherence length. Then for a Gaussian spectrum the axial resolution  $\delta z$  is written:

$$\delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi \Delta \lambda} \lambda^2 \quad (2)$$

where  $\Delta \lambda$  is the optical bandwidth of the light beam.

\* Corresponding author.

E-mail address: luc.froehly@univ-fcomte.fr (L. Froehly).

- Acquisition speed: this is the speed at which images are acquired. As in OCT there could be different level of images considered it has to be precised:
  - Ascan: This means that the image is a line in the sample. For a fixed  $x, y$  position  $z$  is made variable.
  - Bscan: A Bscan is a set of Ascans. In other words a plane in the sample. For a given  $x$  (or  $y$ ) all  $y$  (respectively  $x$ ) and  $z$  are acquired.
  - Volume: This is finally a set of Bscans which finally gives a 3D volume image.
- Sensitivity: In OCT the sensitivity is 'the lower reflectivity that could be detected by the system' [3]. In the case of a shot-noise limited detection system the sensitivity  $S$  could be then read:

$$S = 10 \log \left( \frac{\eta P_s}{2h\nu_0 B} \right) \quad (3)$$

where  $\eta$  is the quantum efficiency of the detector,  $P_s$  the incoming power onto the sample,  $h$  the Planck constant,  $\nu_0$  the light average frequency and  $B$  the detection bandwidth.

## 2.2. Time domain OCT (TDOCT)

Although many precursors could be found to TDOCT systems, it is generally admitted that the 'father' of TDOCT who induced a real 'take-off' of the technique is Fujimoto and co-workers [5]. The application to a diffusive biological tissue with the claim of the real potential of OLCR to discriminate light reflected from a small volume in a sample was also revealed by Clivaz [6] almost simultaneously. TDOCT is based on linear time-domain correlators with a mechanical scanning to get the time correlation (see Fig. 1). A basic equation for TDOCT give the registered Intensity in function of scanning in time  $t$  as:

$$I(t) = \int |e(t)|^2 dt + \int |s(t)|^2 dt + 2\text{Re}\{e(t) \otimes s(t)\} \quad (4)$$

where  $|e(t)|$  is the modulus (normally  $e(t)$  is chosen to be real so that  $|e(t)| = e(t)$ ) of the reference arm signal,  $|s(t)|$  is the modulus of the signal coming back from all scattering layers of the sample,  $\text{Re}$  is the real part and  $\otimes$  denotes the correlation operation.

The first commercial system has been proposed by Carl Zeiss Meditec a decade ago and they have been leading the market until a few years. Concerning reached performances with TDOCT a 1  $\mu\text{m}$  depth resolution in vivo is already reported since 1999 [7]. Concerning the acquisition speed the use of grating based Rapid

Scanning Delay Line introduced first in 93 in autocorrelator for pulse shape measurements [8], has allowed Ascan acquisition rate in OCT as high as 2 kHz with a depth scanning range of 3 mm [9]. In principle the sensitivity of TDOCT systems could reach more than 100 dB as it only depends on the detection bandwidth  $B$  and of the power incident on the sample  $P_s$  (see Section 2.1). With a rapid scanning delay line a 106 dB sensitivity has been reached in vivo with an Ascan rate of 2 kHz and a power onto the sample of 10 mW [10]. For the reader who would like to go further into this technique without reading the whole and extensive bibliography in the subject we deeply recommend some references: of course the paper of Fujimoto and co-workers [5], but also a good review paper on OCT techniques and applications by Fercher et al. [1] and finally this pretty good reference book edited by Drexler and Fujimoto [11].

## 2.3. Spectral domain OCT

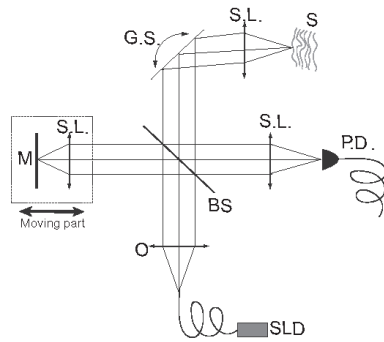
In 2001 Leitgeb has demonstrated a sensitivity gain of 20 dB with an other setup called Fourier Domain OCT [3]. The system is apparently very similar to TDOCT but involves a spectrometer at the interferometer output so that the signal is registered in the spectral plane (see Fig. 2). A basic equation of the FDOCT signal registered at the spectrometer output is given in function of the light frequency  $\nu$ :

$$I(\nu) = |E(\nu)|^2 + |S(\nu)|^2 + 2\text{Re}\{E(\nu) \cdot S(\nu) \cdot e^{i2\pi\nu\tau}\} \quad (5)$$

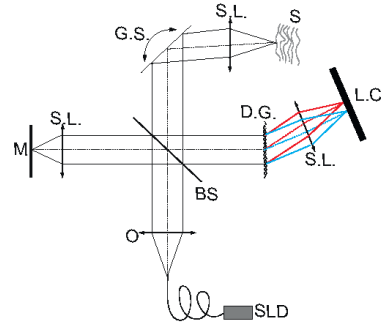
where  $E(\nu), S(\nu)$  are respectively Fourier Transform of  $e(t), s(t)$  and  $\tau$  means the time mismatch between the two unbalanced arm of the interferometer ( $\tau = \frac{d}{c}$  where  $d$  is the difference in optical path between the two arms and  $c$  the speed of light in vacuum). In FDOCT an inverse Fourier Transform is numerically done to come back to the Time Domain. This leads to the following expression:

$$I(t) = e(t) \otimes e(t) + s(t) \otimes s(t) + (e(t) \otimes s(t)) \times (\delta(t - \tau) + \delta(t + \tau)) \quad (6)$$

with  $\otimes$  meaning the convolution operator and  $\delta(\cdot)$  being the Dirac distribution. The main advantage of FDOCT with respect to TDOCT is a higher sensitivity with an increased acquisition speed. The main reason has been accurately described by Leitgeb in 2003 [3]. As in TDOCT the detection Bandwidth  $B$  is given essentially by the time needed to acquire one point of the Ascan we clearly see that we can also gain in acquisition speed in FDOCT as now the detection bandwidth is directly the Ascan rate and then the detector frame



**Fig. 1.** Classical setup for TDOCT (from Ref. [4] by the authors): S.L. Spherical Lens, O. Microscope Objective, S.L.D. Superluminescent Photodiode, B.S. Beam Splitter, G.S. Galvano Scanning Mirror, P.D. Photodiode, M. Mirror, S. Sample.



**Fig. 2.** Classical setup for FDOCT (from Ref. [4] by the authors): S.L. Spherical Lens, O. Microscope Objective, S.L.D. Superluminescent Photodiode, B.S. Beam Splitter, G.S. Galvano Scanning Mirror, L.C. Line Detector, M. Mirror, S. Sample, D.G. Diffraction Grating.

Please cite this article in press as: L. Froehly, J. Météau, Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation, Opt. Fiber Technol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yofte.2012.08.001>

rate. With CMOS linear detector as fast as 100 kHz today there is a tremendous gain both in sensitivity and speed of FDOCT with respect to TDOCT.

The main limitation of the FDOCT setup, as first developed, was essentially the spectrometer resolution. Indeed, as shown in Eq. (6) after back Fourier transforming there are three terms in the Ascan and only one is used to image the tissue. Then half the number of acquired pixels is used effectively to image the sample. The limitation of the pixel size onto the detector implies also a limit in the spectral resolution. This limit in spectral resolution, after Fourier transform operation, directly leads to a sensitivity decay of the system with the measurement depth [3]. Although it is clear that acquisition time itself has increased a lot with FDOCT, the image display time is not necessarily as fast. Indeed FDOCT is consuming a lot of computation time to do first a rescaling of acquired data from wavelength to frequency and then to do Fourier transform operations. Recent works have nevertheless showed tremendous improvements in this real-time displaying capability [12,13].

Although the principle is similar to FDOCT we have to give a short explanation about what is called 'Swept Source OCT' (SSOCT). This system is indeed what today gives the best performances in OCT in term of acquisition speed. SSOCT is in fact a spectral OCT system where the spectral channels demultiplexing is done at the input of the system instead of at the output. Then, compared to the FDOCT system, the output spectrometer is replaced by a single photodiode whereas the laser is now a swept laser source. An A-scan acquisition is obtained by registering onto the photodiode the interferometric signal during one sweeping cycle of the swept laser source. The obtained signal is then, as in FDOCT, a channel spectrum for each spatial point onto the sample. Huge developments are pushed towards the swept source since a few years as it is the key point of this technique to get laser sources with a sweeping rate fast enough for A-scan acquisition together with a broadband sweeping range. Fourier Domain Mode Locked laser sources are the key enabling technology that have been developed by Huber and co-workers since 2006 [14]. State of the art SSOCT systems reach today an A-scan rate of about 1 MHz, with a resolution in tissue of 15  $\mu\text{m}$  at a central wavelength of 1050 nm [15]. To go further into the understanding of SDOCT techniques we recommend the following readings [1,3,11,14,16].

### 3. OCT and supercontinua

#### 3.1. light sources and limitations

Amongst key parameters of OCT systems are speed, resolution and penetration depth. Such performances are mainly defined by the system sensitivity. As seen in the previous paragraph the sensitivity is directly related to the incident power onto the sample. In order to have a high sensitivity for an image integration time short enough and a sufficient penetration depth, it is necessary to have a light source which is bright enough. Generally speaking an OCT system shot-noise limited is sensitive to one back scattered photon from a certain depth per detection element. The main effect of light loss in the 'therapeutic' spectral window is the scattering, if we consider an average mean free path  $l$  and a Beer–Lambert decay law we end-up with the number of back-scattered ballistics photons  $N = N_0 \cdot e^{-2x/l}$ , where  $N_0$  is the incident photon number onto the sample and  $x$  the desired penetration depth. The incident power  $P_0$  necessary to get one back scattered photon at a depth  $x$  is then given by:

$$P_0 = \frac{h\nu_0}{\Delta t} e^{2x/l} \quad (7)$$

where  $h\nu_0$  is the photon energy around the central frequency  $\nu_0$  and  $\Delta t$  is the integration time of the detector. Let us consider an average

mean free path in biological tissue around  $l = 50 \mu\text{m}$ , a penetration depth  $x = 800 \mu\text{m}$ . If we consider that a thermal light source (an arc lamp type for example with a color temperature of about 6000 K which is the closest from the sun brightness), spatially filtered to be 'monomode' spatially, then its average power for a 200 nm bandwidth centered onto 600 nm will be around 1  $\mu\text{W}$ . If in Eq. (7) we set  $P_0$  to be 1  $\mu\text{W}$  we end up with an integration time necessary onto the detector of about 26 s. Such a time is obviously not compatible with real-time imaging of in vivo biological tissues. Thermal light sources could be anyway used for ultra-high resolution OCT imaging [17] but at the cost of an increased integration time and a lower penetration depth (1 s and 300–400  $\mu\text{m}$ ). The advantage of such light sources is first their low cost and also that they are spatially incoherent so that they are especially interesting in full-field OCT where the spatial speckle is naturally removed, increasing hence the image quality.

Superluminescent diodes are mainly used in OCT as they offer an increased brightness with respect to thermal light sources (a factor of 1000) although the bandwidth is reduced, they also benefit from compactness and prices which are still affordable. Such sources have average power of about 1–10 mW for a bandwidth which can reach around 80 nm. As a comparison with the previous example of thermal light source the integration time is now of a few ms. In the case of Supercontinuum light sources they are coupling the advantage of a high brightness (with a power between 100  $\mu\text{W}/\text{nm}$  and a few mW/nm) and an ultra-broad bandwidth (400–2000 nm) this is why they found an increasing interest in the frame of OCT systems. In such a case the integration time may fall down to a few hundreds of  $\mu\text{s}$  giving rise to a dramatic overall gain in the acquisition frame rate. Many other light sources have been developed and used in OCT as broadband modelocked  $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$  [18,19], diode pumped lasers [20], multiplexed superluminescent diode sources [21], but supercontinuum generation seems to be of special interest in combining almost all requirements for OCT imaging at a cost which is decreasing over years.

#### 3.2. Short supercontinuum generation history

Although the subject of this paper is not about supercontinuum generation, we would like here to give anyway a very short snapshot about this subject to give a more comprehensive overview of their interest in OCT. To go into a detailed and complete understanding of supercontinuum history and generation we recommend the following readings [22,23]. Although the term of supercontinuum appeared in the middle of the eighties [24] the history of these 'broadband' and bright light sources began in the early seventies [25]. In fact the broadening of laser light through non-linear interactions with matter seems even more old than that [26] but the main difference with the experiment of Ref. [25] was the dramatic extent of the broadening which was in fact 10 times broader than previous experiments. Supercontinuum have been generated in different media like bulk media [25], glasses [27], conventional fibers [28] and photonic crystal fibers [29,30]. Basically the principle to generate a supercontinuum is always the same: a narrow-band incident pulse is tightly focused onto a medium so that the local light intensity is so high that numerous non-linear effects are generated into the medium. Such non-linear effects leads to the spectral broadening of the initial spectrum yielding a broadband spectrally continuous output spectrum. Two classical processes for supercontinuum generation into optical fibers use either nanosecond initial pulses or femtosecond one. The generated supercontinuum have slightly different properties in the two cases and may be preferred one to the other depending on the application [22]. To summarize: in the femtosecond regime the generated supercontinua have generally a higher average power and a more stable spectral phase (which benefits

Please cite this article in press as: L. Froehly, J. Météau, Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation, Opt. Fiber Technol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yofte.2012.08.001>

applications where temporal coherence is of importance). On the other side supercontinuum in nanosecond regime is non-coherent temporally and has a lower average power. Today mostly the commercial supercontinuum laser sources available are using optical fibers and they could be found with different pumping regime, average power and pulses lengths. The main providers of such white light sources are in Europe: NKT Photonics (Denmark), Fianium (UK), Leukos Innovative Optical Systems (France) and Toptica (Germany). In the case of Toptica the light source is in fact a tunable laser source based on a supercontinuum. Leukos Innovative Optical Systems does also provide a supercontinuum in the nanosecond regime with a blue extension down to 320 nm (patented). The prices of supercontinuum range from 16000\$ to 50000\$ depending essentially on the generation process complexity and on the average output power.

### 3.3. Supercontinuum use in OCT

The first report of OCT using supercontinuum generation was already published a decade ago [312]. A resolution of 2.5  $\mu\text{m}$  at a central wavelength of 1300 nm was demonstrated what was the best resolution achieved in this region although better resolution (1  $\mu\text{m}$ ) was achieved in the 800 nm region using sub-two cycles pulses with bandwidth of up to 350 nm [2]. Submicrometer resolution (0.75  $\mu\text{m}$ ) was then demonstrated again in the 800 nm range [32] combining a Photonic Crystal Fiber (PCF) with a compact, commercially available sub 10-fs Ti:Sapphire laser as a pump source. The output power was a few tens of milliwatts over the 550–950 nm generated bandwidth of the supercontinuum. In 2003 Wang et al. proposed a 1100 nm center wavelength system with a resolution of 1.3  $\mu\text{m}$  in tissue and an imaging depth of about 1 mm. Such performances were made possible due to the central wavelength range known to improve the depth penetration of light into tissues with respect to the 800 nm one. The drawback of using a longer central wavelength is the necessity to increase the spectral bandwidth to maintain a good axial resolution (because of the  $\lambda^2/\Delta\lambda$  dependance of the longitudinal resolution), hence it was necessary to have a spectral bandwidth as wide as 372 nm. In this paper the lateral resolution was also kept constant (4  $\mu\text{m}$ ) over depth thanks to a dynamic focusing system implementation. Systems based on femtosecond pump laser sources have been first expansive and complex. The development and the use of low-threshold femtosecond lasers with inexpensive low-power pump lasers have allowed a reduction in costs of such laser sources [33,34] but such sources are still complex although effort are pushed towards simplifying such systems [35,36]. In parallel to supercontinuum light sources in the femtosecond regime there have been also several works proposing alternative approach. It is notably the case of continuous-wave supercontinuum first proposed and demonstrated in the frame of an OCT system in 2004 by Hsiung [37]. Such a laser source was promising “to enable ultrahigh resolution, high-speed OCT imaging with lower cost and complexity than with femtosecond laser-based light sources”. Other points are being mentioned in Ref. [37] when using supercontinuum in femtosecond regime: these are the spectral modulation, that reduces the contrast of the Point Spread Function, temporal instability and non linearly amplified quantum noise which both influence the excess intensity noise [38] hence reducing the detection sensitivity of the OCT system. Performances of this system have proved to give *in vivo* OCT imaging at a Bscan rate of 3 Hz with a  $500 \times 1000$  pixels dimension (transverse  $\times$  axial) for a covered area of  $2.25 \times 1.8 \text{ mm}^2$ . This corresponds to an axial resolution of about 5  $\mu\text{m}$  in the medium. Supercontinuum generation using subnanosecond regime pump pulses issued from microchips lasers are also the subject of intense researches [39–41] in order to decrease the source costs and to provide compact and reliable sources with an increased stability. Such

sources are now able to cover a spectrum which ranges from 350 nm until 2100 nm but of course with a power density per nm bandwidth lower than that of supercontinuum in the femtosecond regime. The development of ultra-broadband supercontinuum covering both the 800 nm band and the 1300 nm one and the possibility to generate ‘spectrally shaped’ supercontinuum has also enabled the so called ‘dual-band’ imaging capability of OCT systems [42–45]. Indeed the 830 nm is often used in ophthalmology whereas the 1300 nm better fits for highly scattering tissues (like skin) as the scattering is reduced (the scattering is proportional to  $1/\lambda^k$  where  $k$  is a constant which depends on the scatterers nature). Spectral fluctuations of first generation supercontinua were often mentioned as a source of image degradation, especially in the frame of TD OCT. With the development of Fourier Domain OCT this has dramatically changed as there is a direct access to spectral content with this technique it is then easier to detect any fluctuation of the spectrum shape. Furthermore as the acquisition is faster it is also easier to acquire A-scans in a time scale which is closer from supercontinuum fluctuations. Numerical spectral re-shaping was demonstrated in an FDOCT system coupled to a supercontinuum light source. This was enabling *in vivo* ophthalmic images of the cornea and of the macula lutea at 128  $\mu\text{s}/\text{A} - \text{scan}$  with respectively 550/1450 A-scans per image. The achieved resolution was 3  $\mu\text{m}$  in the tissue with an image depth of about 450  $\mu\text{m}$ . The coupling of the dual-band imaging modality using supercontinuum as a light source and FDOCT system enables enhanced imaging contrast through spectroscopic feature detection [46]. The extremely broad-bandwidth and the brightness of such laser sources are even opening the possibility for real-time depth resolved tomographic imaging using ‘scan-free’ time domain correlators [47,48].

### 4. Scan free system and depth dependant dispersion compensation

As seen in the Section 3 one of the main advantages of supercontinuum in OCT is that they fulfill two requirements: a broad spectral bandwidth and a high photon density per spatio/temporal cell. Such performances are especially interesting for ‘scan-free’ time domain correlator based OCT systems. Such systems are indeed intermediate systems between TD OCT and FDOCT one. Hence they couple direct registration of an A-scan in the time domain without any need of scanning to get the time correlation. This property is at the cost of a sensitivity lower than that of FDOCT systems. Despite this lower sensitivity *in vivo* images of a human nail-fold region were demonstrated [49] at a 97 kHz A-scan rate, 93 dB sensitivity,  $4 \text{ mm} \times 2.6 \text{ mm}$  (lateral range vs axial range in the image) and 14  $\mu\text{m}$  axial resolution. Watanabe used an InGaAs line scan camera with 512 pixels and a superluminescent diode with center wavelength 1.33  $\mu\text{m}$  and a full width at half-maximum spectral width of 57.6 nm. A proof of principle for real-time spectroscopic OCT based on optical demultiplexing coupled to scan-free correlation has also been demonstrated using such systems [47,48]. We anticipate that the development of compact, cheaper, supercontinuum laser sources may be a further opportunity to improve the performances of such devices. An extensive overview of the state of the art and properties of such systems is given in [4] so that we will not emphasize on that. We will focus in this research part on the dispersion compensation problem, encountered especially in the case of broad bandwidth light sources, that found an original solution in the frame of scan-free correlators.

#### 4.1. problem description and state of the art

In OCT the depth resolution (e.g. coherence length) is intrinsically determined by the source spectral bandwidth through the

Please cite this article in press as: L. Froehly, J. Météau, Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation, Opt. Fiber Technol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jyofte.2012.08.001>



classical Fourier-Heisenberg relation  $\Delta d \cdot \Delta v = c$ . This means that high depth resolution is achieved using a wide spectral bandwidth. The drawback is that it produces an increase of the group velocity dispersion induced by the sample and then a broadening of the OCT axial point spread function. This effect has been investigated for years [7] and numerous techniques have been proposed to compensate partially the dispersion. There are two main categories of dispersion compensation methods: hardware ('real-time' compensation) and software (post-numerical processing). Numerical compensation has proven to be quite efficient for imaging of retina up to the third order dispersion coefficients [50]. This kind of methods requires anyway significant data post processing. Hardware compensation methods are mainly non depth dependant. The main procedure is to add in the reference arm of the interferometer a cell with a medium with an average dispersion similar to that of the inspected sample [32]. In TD-OCT some depth dependant dispersion compensation systems were proposed a decade ago [51]. They are based on a frequency domain optical delay line. This system uses the dispersion property already known in pulse compression. It does add a dispersion law that is 'linearly' dependant on the scanner position (e.g. the scanning depth position). We will demonstrate theoretically and experimentally the possibility to take advantage from this interesting grating property in our static delay line OCT system (Fig. 3) leading to a static depth dependant dispersion compensation.

#### 4.2. Setup

The setup we use is the one of Fig. 3. It is composed of three main parts: firstly the sample information is encoded via a 'Mach-Zehnder like' interferometer. The latter is illuminated with a SM-100 supercontinuum white light source provided by Leukos Innovative Optical Systems. The Supercontinuum has a full spectral range from 500 nm up to 2300 nm. However in experiments reported here, the effective bandwidth is of 150 nm (Full Width

at Half Maximum) centered around 625 nm. Secondly the light beams issued from the interferometer are directed toward a transmission diffraction grating disposed in the perpendicular direction. Because of the incident angles of the two beams, the transverse direction of the diffraction grating introduces a time-delay varying linearly between the recombined beams. The sample depth is thus encoded across the grating that forms a time correlation axis. The third part of the set-up is primarily an imaging system that forms the image of the diffraction grating on a two dimensional CCD image sensor (8 bits,  $1256 \times 1024$  pixels, 20 fps in binning mode). Then the lines of the CCD camera encode the depth of the sample and a A-scan is obtained without scanning along the image lines.

##### 4.2.1. Correlation expression derivation onto the Detector

The total recorded signal is the sum in intensity of individual fringe patterns formed by each wavelength of the incident beams. Two temporal signals  $r(t)$  and  $s(t)$  with the same polarization state are incident onto the grating (G) with opposite angles  $\theta_i$  and  $-\theta_i$ .  $r(t)$  and  $s(t)$  have complex spectrum given by  $\hat{R}(v)$  and  $\hat{S}(v)$  respectively where  $\hat{R}(v)$  and  $\hat{S}(v)$  are Fourier transforms of  $r(t)$  and  $s(t)$ .  $\hat{R}(v)$  and  $\hat{S}(v)$  can be expressed with their complex form  $\hat{R}(v) = R(v)e^{i\phi_R(v)}$  and  $\hat{S}(v) = S(v)e^{i\phi_S(v)}$ . We consider in the following one diffracted beam ( $-1$  order) the other one being only transmitted by the diffraction grating (zero order). The modulus of the spectrum of the diffracted beam is directly accessible in the spectral plane of the spectrometer which is physically in the back focal plane of the lens L. The other beam that is simply transmitted by the grating is focused at a single point in the same back focal plane. Based on upper considerations a simple analysis leads to the expression of total intensity  $C(z)$  in the plane D (the reader may refer to Ref. [48] for a complete analysis):

$$C(z) = I_0 + 2\text{Re} \left[ \int \hat{R}(v)\hat{S}(v)e^{-j2\pi(\frac{z}{\lambda_0}(2\sin\theta_i))v}e^{j\frac{2\pi v^2}{2\lambda_0}}dv \right] \quad (8)$$

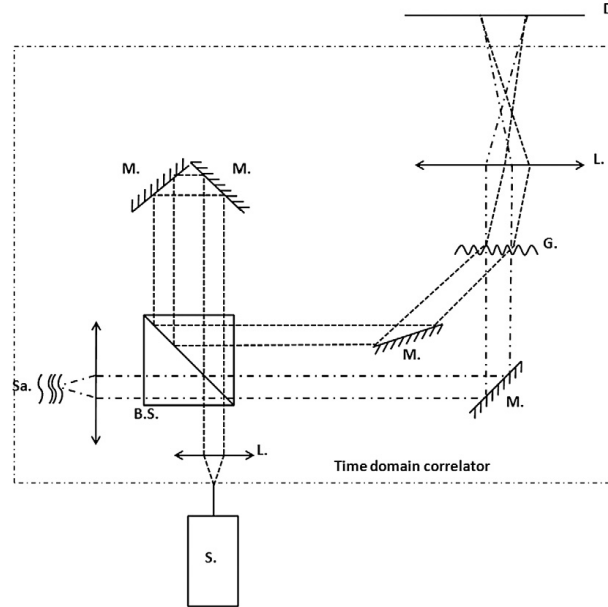


Fig. 3. Scan-free time domain correlator: S. Supercontinuum laser source, L. Lens, B.S. Beam Splitter, M. Mirror, G. Diffraction Grating, Sa. Sample, D. CCD detector.

Please cite this article in press as: L. Froehly, J. Météau, Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation, Opt. Fiber Technol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yofte.2012.08.001>

where  $z$  is the horizontal coordinate along the CCD camera lines,  $I_0$  the background intensity,  $\mathcal{R}e$  designs the real part.  $\Lambda$  is the grating period,  $\gamma$  the magnification of the imaging system. (The reference beam  $\hat{R}(v)$  is assumed to be real while  $\hat{S}(v)$  can be either real or complex depending on the optical sample properties.)

#### 4.2.2. Depth dependant expression derivation

The possibility to compensate for second or third order dispersion term with 'scan-free time domain correlators' based on wavefront aberration was previously demonstrated [52,53]. The expression of the phase term that induces dispersion by a defocus of the imaged plane from a distance  $d$  to the grating plane (see Fig. 4a) has been shown to be:

$$\Phi(z, d) = \left( \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta_i - \frac{2\pi}{\Lambda} \right) z + \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \left[ \sqrt{1 - \left( -\frac{\lambda}{\Lambda} + \sin \theta_i \right)^2} - \cos \theta_i \right] \cdot d \quad (9)$$

where the second term, proportional to  $d$ :  $\left( \Phi_{disp}(d) = \frac{2\pi}{\lambda} \left[ \sqrt{1 - \left( -\frac{\lambda}{\Lambda} + \sin \theta_i \right)^2} - \cos \theta_i \right] \cdot d \right)$ , is non linear with light frequency but linear with  $d$ . This term is responsible at first glance for second order terms as well as for lower higher order dispersion terms.

If the grating is tilted from an angle  $\alpha$  with respect to the images plane (P) (Fig. 4b)  $d$  becomes variable with respect to the dimension  $z$  following  $d = \tan \alpha \cdot z$ . Hence we should expect a dispersion which is linearly variable with  $z$  (i.e. the sample depth) as the phase  $\Phi_{disp}(d)$  is now expressed as:

$$\Phi_{disp}(z) = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \left[ \sqrt{1 - \left( -\frac{\lambda}{\Lambda} + \sin \theta_i \right)^2} - \cos \theta_i \right] \cdot \tan \alpha \cdot z \quad (10)$$

Eq. (9) is the basis for the depth dependant compensation property of our correlator. It has here to be noticed that the grating could be staid fixed whereas the CCD could be tilted by an angle  $\gamma \cdot \alpha$ , where  $\gamma$  is the imaging system magnification, this being equivalent to tilting the grating.

#### 4.2.3. Experimental protocol for depth dependant dispersion compensation demonstration

To demonstrate the validity of this idea we used the configuration of Fig. 5. In the actual configuration the depth range we are able to cover is 1200  $\mu\text{m}$  single pass, in air (almost 400  $\mu\text{m}$  in a sample of refractive index 1.5). To clearly view a dispersion effect on this thickness with a 150 nm bandwidth it is necessary to have a strongly dispersive structured material. Alternatively we can

'emulate' a strong dispersion with glass plates, as a phase sample Sa (composed of eight microscope cover slides fanned out-each has an almost 150  $\mu\text{m}$  thickness), inserted within the reference arm in transmission instead of in reflection. Because we are in a single pass configuration onto the grating we induce a total dispersion which is the total dispersion of the sample for a global path length difference which is only  $(n - 1) \cdot e$  where  $n$  is the refractive index of the sample (here the one of glass) and  $e$  is the total thickness of the sample. It is exactly as if we had used a sample with twice the dispersion for a global thickness of the sample which is only 320  $\mu\text{m}$  ( $(n - 1) \cdot e$  with  $n = 1.5$  and  $e = 640 \mu\text{m}$ ).

#### 4.3. Results and discussion

Fig. 6a and b respectively shows the A-scans obtained when there is no depth dependant dispersion compensation (no grating tilt) and with dispersion compensation (the grating 'equivalent-tilt' is 16.26°). The different peaks correspond to the different optical paths the reference wavefront has traveled along  $z$  (different glass thicknesses-see Fig. 5). Normally we should expect 9 picks (8 glass plates + one path into air) evenly spaced but only 7 are clearly visible due to an uncomplete fan out of the glass plates. The depth dependant dispersion compensation appears clearly in Fig. 6b, where the resolution keeps constant over propagation through glass plates whereas it is not the case in Fig. 6a.

Although from this observation it is clear that depth dependant dispersion compensation is feasible with this system it is necessary to compare the obtained results with what could have been expected from Eq. (9). The comparison between simulations and experimental results consist first in the determination of the angle  $\alpha$  needed to compensate for the sample dispersion using Eq. (9) and then in the measurement of the grating tilt we have effectively applied to compensate for the sample dispersion. Theoretically the angle is obtained by knowing the defocusing  $d$  necessary to obtain dispersion compensation for the full sample Sa thickness and the dimension of the spot onto the grating. It has to be noticed that theoretical values of  $d$  have been calculated so that the residual dispersion (essentially a quadratic term) is lowered to its minimal value. There is a range of  $d$  around this value where the PSF (auto-correlation) is almost unchanged as the residual dispersion remains narrower than the theoretical PSF. Considering a source bandwidth of 150 nm, a central wavelength of 625 nm and an initial incidence angle onto the grating of 28° we find a grating twisting angle  $\alpha$  of 16.70°. It is equivalent to tilt the grating or to tilt the CCD if we take into account the system magnification. In practice we use a combination of grating tilt and CCD tilt. Indeed tilting too much the grating changes the diffraction efficiency and also the overlap of the reference and sample arm that we have to

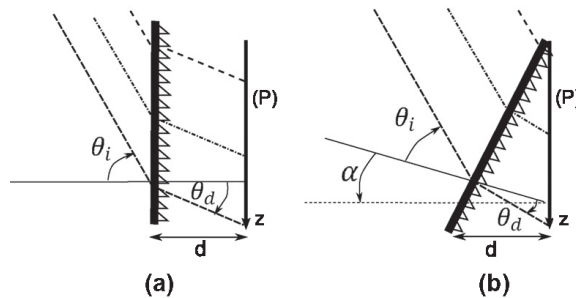


Fig. 4. Parameters for dispersion calculation: (a) global dispersion compensation and (b) depth dependant dispersion compensation.

Please cite this article in press as: L. Froehly, J. Météau, Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation, Opt. Fiber Technol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yofte.2012.08.001>

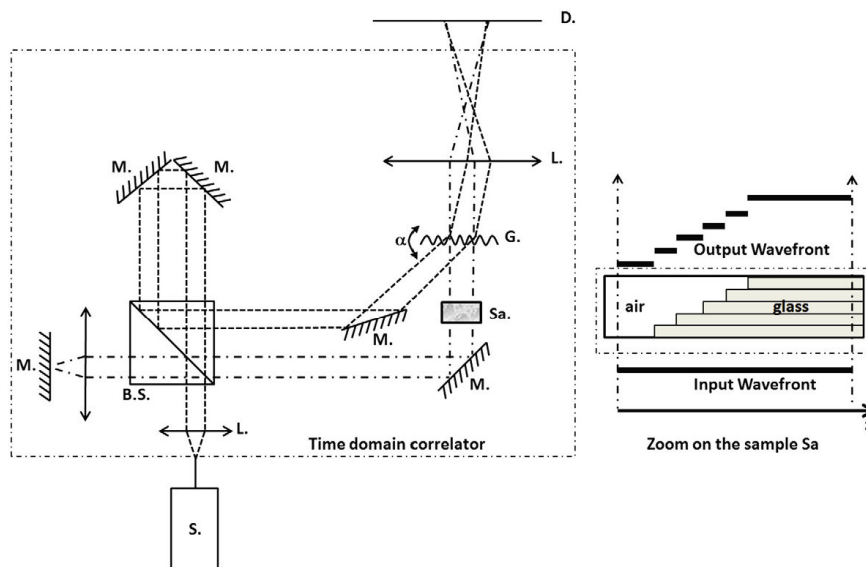


Fig. 5. Scan-free Time domain correlator: S. Supercontinuum laser source, L. Lens, B.S. Beam Splitter, M. Mirror, G. Diffraction Grating, Sa. Sample, D. CCD detector,  $\alpha$  rotation angle of the grating G.

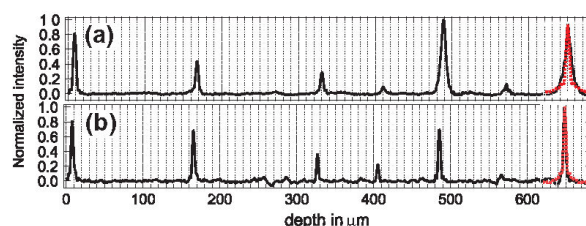


Fig. 6. Real-time depth dependant dispersion compensation: (a) A-scan without depth dependant dispersion compensation and (b) A-scan with depth dependant dispersion compensation. In dotted red lines are the theoretical auto-correlation peaks computed from the spectrum itself.

realign slightly. On the other hand a too strong tilt of the CCD leads to vignetting onto the detector as our detector is packaged with a sensor area placed 2 cms behind the mount. Considering a magnification of our imaging system of 3.6, a grating tilt of  $16.70^\circ$  corresponds to an angle of the CCD of  $58^\circ$  what produces a strong vignetting which reduces dramatically the depth range. Although we balance the tilt between the grating and the CCD for a sake of clarity we will only refer to the grating equivalent tilt. Finally experimentally to compensate for the dispersion of the full sample the grating was tilted from an angle of  $16.26^\circ$  what is pretty close from the theoretical angle of  $16.70^\circ$ . The difference is due to the error made on the measurement of the spot size onto the grating. An error of only 3% ( $30\text{ }\mu\text{m}$  over  $1000\text{ }\mu\text{m}$ ) compensates this difference and our spot measurement precision is close to 10%.

In principle it was shown that a small defocus  $d$  of the grating plane with respect to the imaging plane enables to compensate for a huge amount of glass [52]. In the present case the maximum thickness we can compensate for, considering the central wavelength, the bandwidth and the grating parameters would be  $11.30\text{ mm}$  for a defocus  $d_{\text{max}} = 7.2\text{ mm}$ . This is true for a global dispersion

compensation but here as we use to compensate for depth dependant dispersion this means that  $d$  should vary from 0 to  $d_{\text{max}}$  over the spot diameter  $D$  what gives the grating angle  $\alpha = \text{atan}(d_{\text{max}}/D)$ . It is then obvious here that if we want to keep  $\alpha$  reasonably small (for reasons discussed in the previous paragraph)  $d_{\text{max}}$  could not be reached. Practically if we use a  $D = 3\text{ mm}$  beam and if we accept a  $10^\circ$  tilt of the grating we shall be able already to compensate for a depth dependant dispersion up to a glass thickness of about  $700\text{ }\mu\text{m}$  what is already close to our actual value of  $640\text{ }\mu\text{m}$  although the spot size is only  $1\text{ mm}$ . It has to be noticed here that in our case we have also played on the tilt of the CCD what is virtually the same as a supplementary tilt of the grating.

## 5. Conclusion

The commercial development of supercontinuum light sources since a decade is a great potential for OCT imaging as such light sources are very broad-band light sources (more than  $1000\text{ nm}$  bandwidth) with a brightness which is at least ten times better

Please cite this article in press as: L. Froehly, J. Météau, Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation, Opt. Fiber Technol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yofte.2012.08.001>

than superluminescent diodes (SLD). The price of such sources is still more expensive (although decreasing every year) than SLD but they cover the spectral range of several SLDs. Main interest until now for such systems in tomographic imaging is demonstrated through spectroscopic applications (dual-band imaging, spectroscopic OCT). With the ever increasing performances of such light sources we could hope that coherent non-linear interactions may also become more relevant in the future as a contrast agent in OCT. The power density of such light sources is also extremely interesting for OCT systems that have a lower sensitivity than FDOCT systems as 'scan-free' time domain correlator. For medium on which a few mW do not generate any damage, such systems seem to have some interest in terms of signal optical processing. We have shown in that paper that in the case of a broad-band light source (a supercontinuum) such a system is able to optically process a depth dependant dispersion compensation what is normally done numerically. Finally we think that supercontinuum light sources are really a key development for OCT as they combine the bandwidth of thermal light sources and the brightness of laser sources. The main challenges in the development of such sources is still in terms of cost reductions and spectrum smoothness. Both parameters are still at the advantage of the nanosecond regime supercontinua.

#### Acknowledgments

We would like to thank the 'Leukos Innovative Optical Systems' company which provides us with supercontinuum laser sources with a constant care about the performances that are necessary for a given application.

#### References

- [1] A.F. Fercher, W. Drexler, C.K. Hitzenberger, T. Lasser, Optical coherence tomography – principles and applications, *Rep. Prog. Phys.* 66 (2003) 239–303.
- [2] W. Drexler, U. Morgner, F.X. Kartner, C. Pitris, S.A. Boppart, X.D. Li, E.P. Ippen, J.G. Fujimoto, In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography, *Opt. Lett.* 24 (17) (1999) 1221–1223.
- [3] R. Leitgeb, C.K. Hitzenberger, A.F. Fercher, of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography, *Opt. Express* 11 (2003) 889–894.
- [4] L. Froehly, R. Leitgeb, Scan-free optical correlation techniques: history and applications to optical coherence tomography, *J. Opt.* 12 (2010) 084001.
- [5] D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Chang, M.R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C.A. Puliafito, J.G. Fujimoto, Opt. Coherence Tomogr. Sci. 254 (1991) 1178.
- [6] X. Clivaz, F. Marquis-Weible, R.P. Salathé, R.P. Novák, H.H. Gilgen, High-resolution reflectometry in biological tissues, *Opt. Lett.* 17 (1992) 4–6.
- [7] U. Morgner, W. Drexler, J.G. Fujimoto, In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography, *Opt. Lett.* 24 (1999) 1221–1223.
- [8] K.F. Kwong, D. Yankelevich, K.C. Chu, J.P. Heritage, A. Dienes, 400-Hz mechanical scanning optical delay line, *Opt. Lett.* 18 (1993) 558–560.
- [9] G.J. Tearney, B.E. Bouma, J.G. Fujimoto, High-speed phase- and group-delay scanning with a grating-based phase control delay line, *Opt. Lett.* 22 (1997) 1811–1813.
- [10] G.J. Tearney, M.E. Brezinski, B.E. Bouma, S.A. Boppart, C. Pitris, J.F. Southern, J.G. Fujimoto, In vivo endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography, *Science* 276 (1997) 20–37.
- [11] W. Drexler, J.G. Fujimoto, Optical Coherence Tomography: Technology and Applications, Springer-Verlag, 2008.
- [12] T.E. Ustun, N.V. Iftimia, R.D. Ferguson, D.X. Hammer, Real-time processing for Fourier domain optical coherence tomography using a field programmable gate array, *Rev. Sc. Inst.* 79 (2008) 114301–114310.
- [13] Y. Watanabe, T. Itagaki, Real-time display on Fourier domain optical coherence tomography system using a graphics processing unit, *J. Biom. Opt.* 14 (2009) 060506.
- [14] R. Huber, M. Wojtkowski, J.G. Fujimoto, Fourier domain mode locking (FDML): a new laser operating regime and applications for optical coherence tomography, *Opt. Express* 14 (8) (2006) 3225–3237.
- [15] T. Klein, W. Wieser, C.M. Eigenwillig, B.R. Biedermann, R. Huber, Megahertz OCT for ultrawide-field retinal imaging with a 1050 nm Fourier domain mode-locked laser, *Opt. Express* 19 (2011) 3044–3062.
- [16] M.A. Choma, M.V. Sarunic, C. Yang, J.A. Izatt, Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography, *Opt. Express* 11 (18) (2003) 2183–2189.
- [17] D. Sacchet, J. Moreau, P. Georges, A. Dubois, Simultaneous dual-band ultrahigh resolution full-field optical coherence tomography, *Opt. Express* 16 (2008) 19434–19446.
- [18] B. Bouma, G.J. Tearney, S.A. Boppart, M.R. Hee, M.E. Brezinski, J.G. Fujimoto, High-resolution optical coherence tomographic imaging using a mode-locked Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> laser source, *Opt. Lett.* 20 (1995) 1486–1488.
- [19] W. Drexler, U. Morgner, F.X. Kartner, C. Pitris, S.A. Boppart, X.D. Li, E.P. Ippen, J.G. Fujimoto, In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography, *Opt. Lett.* 24 (1999) 1221–1223.
- [20] P. Wagenblast, T. Ko, J. Fujimoto, F. Kaertner, U. Morgner, Ultrahigh-resolution optical coherence tomography with a diode-pumped broadband Cr<sup>3+</sup>:LiCAF laser, *Opt. Express* 12 (2004) 3257–3263.
- [21] T. Ko, D. Adler, J. Fujimoto, D. Mamedov, V. Prokhorov, V. Shidlovski, S. Yakubovich, Ultrahigh resolution optical coherence tomography imaging with a broadband superluminescent diode light source, *Opt. Express* 12 (2004) 2112–2119.
- [22] J.M. Dudley, L. Provino, N. Grossard, H. Maillotte, R.S. Windeler, B.J. Eggleton, S. Coen, Supercontinuum generation in airsilica microstructured fibers with nanosecond and femtosecond pulse pumping, *J. Opt. Soc. Am. B* 19 (4) (2002) 765.
- [23] J.M. Dudley, G. Genty, S. Coen, Supercontinuum generation in photonic crystal fiber, *Rev. Mod. Phys.* 78 (4) (2006).
- [24] J.T. Manassah, P.P. Ho, A. Katz, R.R. Alfano, Ultrafast supercontinuum laser source, *Phot. Spectra* 18 (1984) 53–59.
- [25] R.R. Alfano, S.L. Shapiro, Emission in the region 4000 to 7000 Å via four-photon coupling in glass, *Phys. Rev. Lett.* 24 (1970) 584–587.
- [26] B.P. Stoicheff, Characteristics of stimulated Raman radiation generated by coherent light, *Phys. Lett.* 7 (1963) 186–188.
- [27] P. Corkum, C. Rolland, T. Srinivasan-Rao, Supercontinuum generation in gases, *Phys. Rev. Lett.* 57 (18) (1986) 2268–2271.
- [28] C. Lin, R.H. Stolen, New nanosecond continuum for excited-state spectroscopy, *Appl. Phys. Lett.* 28 (1976) 216–218.
- [29] J.K. Ranka, R.S. Windeler, A.J. Stentz, Optical properties of high-delta air-silica microstructure optical fibers, *Opt. Lett.* 25 (2000) 796–798.
- [30] W.J. Wadsworth, J.C. Knight, A. Ortigosa-Blanch, J. Arriaga, E. Silvestre, P.St.J. Russell, Soliton effects in photonic crystal fibres at 850 nm, *Electron. Lett.* 36 (2000) 5355.
- [31] I. Hartl, X.D. Li, C. Chudoba, R.K. Ghanta, T.H. Ko, J.G. Fujimoto, J.K. Ranka, R.S. Windeler, Ultrahigh-resolution optical coherence tomography using continuum generation in an airsilica microstructure optical fiber, *Opt. Lett.* 26 (9) (2001) 608.
- [32] B. Povazay, K. Bizheva, A. Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, A.F. Fercher, W. Drexler, A. Apolonski, W.J. Wadsworth, J.C. Knight, P.St.J. Russell, M. Wetterlein, E. Scherzer, Submicrometer axial resolution optical coherence tomography, *Opt. Lett.* 27 (20) (2002) 1800.
- [33] A.M. Jr. Kowalevich, T.R. Schibli, F.X. Kartner, J.G. Fujimoto, Ultralow-threshold Kerr-lens mode-locked Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> laser, *Opt. Lett.* 27 (2002) 2037–2039.
- [34] A. Unterhuber, B. Povazay, B. Hermann, H. Sattmann, W. Drexler, V. Yakovlev, G. Tempea, C. Schubert, E.M. Anger, P.K. Ahnelt, M. Stur, J.E. Morgan, A. Cowey, G. Jung, T. Le, A. Stingl, Compact, low-cost Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> laser for in vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography, *Opt. Lett.* 28 (2003) 905–907.
- [35] K. Bizheva, B. Povazay, B. Hermann, H. Sattmann, W. Drexler, M. Mei, R. Holzwarth, T. Hoelzenbein, V. Wacheck, H. Pehamberger, Compact, broadband fiber laser for sub-2-microm axial resolution optical coherence tomography in the 1300-nm wavelength region, *Opt. Lett.* 28 (9) (2003) 707–709.
- [36] S. Bourquin, A. Aguirre, I. Hartl, P. Hsiung, T. Ko, J.G. Fujimoto, T. Birks, W. Wadsworth, U. Bnting, D. Kopf, Ultrahigh resolution real time OCT imaging using a compact femtosecond Nd:Glass laser and nonlinear fiber, *Opt. Express* 11 (2003) 3290–3297.
- [37] P.L. Hsiung, Y. Chen, T.H. Ko, J.G. Fujimoto, C.J.S. de Matos, S.V. Popov, J.R. Taylor, V.P. Gaponov, Optical coherence tomography using a continuous-wave, high-power, Raman continuum light source, *Opt. Express* 12 (22) (2004) 5287.
- [38] K.L. Corwin, N.R. Newbury, J.M. Dudley, S. Coen, S.A. Diddams, K. Weber, R.S. Windeler, Fundamental noise limitations to supercontinuum generation in microstructure fiber, *Phys. Rev. Lett.* 90 (11) (2002) 113904.
- [39] L. Provino, J.M. Dudley, H. Maillotte, N. Grossard, R.S. Windeler, B.J. Eggleton, Compact broadband continuum source based on microchip laser-pumped microstructured fibre, *Electron. Lett.* 37 (2001) 558–560.
- [40] P.A. Champert, V. Couderc, P. Leproux, S. Fevrier, V. Tombelaine, L. Labonte, P. Roy, C. Froehly, P. Nerin, White-light supercontinuum generation in normally dispersive optical fiber using original multi-wavelength pumping system, *Opt. Express* 12 (19) (2004) 4366–4371.
- [41] V. Tombelaine, C. Lesigne, P. Leproux, L. Grossard, V. Couderc, J.L. Auguste, J.M. Blondy, G. Huss, P.H. Plioger, Ultra wide band supercontinuum generation in air-silica holey fibers by SHG-induced modulation instabilities, *Opt. Express* 13 (2005) 7399–7404.
- [42] K.M. Hilligsøe, T. Andersen, H. Paulsen, C. Nielsen, K. Mølmer, S. Keiding, R. Kristiansen, K.P. Hansen, J.J. Larsen, Supercontinuum generation in a photonic crystal fiber with two zero dispersion wavelengths, *Opt. Express* 12 (6) (2004) 1045–1054.
- [43] H. Wang, A.M. Rollins, Dual Band Supercontinuum Light Source for OCT in Biomedical Optics 2006 Technical Digest, Optical Society of America, 2006, Tu30.
- [44] A. Aguirre, N. Nishizawa, J.G. Fujimoto, W. Seitz, M. Lederer, D. Kopf, Continuum generation in a novel photonic crystal fiber for ultrahigh resolution optical coherence tomography at 800 nm and 1300 nm, *Opt. Express* 14 (3) (2006) 1145.

Please cite this article in press as: L. Froehly, J. Météau, Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation, *Opt. Fiber Technol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yofte.2012.08.001>



- [45] H. Wang, A.M. Rollins, Optimization of dual-band continuum light source for ultrahigh-resolution optical coherence tomography, *Appl. Opt.* 46 (2007) 1787–1794.
- [46] F. Spöler, S. Kray, P. Grychtol, B. Hermes, J. Bornemann, M. Frst, H. Kurz, Simultaneous dual-band ultra-high resolution optical coherence tomography, *Opt. Express* 15 (17) (2007) 10832.
- [47] L. Froehly, M. Ouadour, G. Petitjean, L. Furfaro, P. Sandoz, T. Gharbi, P. Leproux, G. Huss, V. Couderc, Real-Time Optical Coherence Spectrotomography: Proof of Principle, *Biophotonics and New Therapy Frontiers*, vol. 6191 SPIE, April 2006.
- [48] L. Froehly, M. Ouadour, L. Furfaro, P. Sandoz, T. Gharbi, P. Leproux, G. Huss, V. Couderc, Spectroscopic OCT by grating-based temporal correlation coupled to optical spectral analysis, *Int. J. Biom. Imaging* 2008 (2008).
- [49] Y. Watanabe, F. Sajima, T. Itagaki, K. Watanabe, Y. Shuto, High-speed linear detection time domain optical coherence tomography with reflective gratings-generated spatial reference delay, *App. Opt.* 48 (2009) 3401–3406.
- [50] M. Wojtkowski, V. Srinivasan, T. Ko, J.G. Fujimoto, A. Kowalczyk, J. Duker, Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation, *Opt. Express* 12 (2004) 2404–2422.
- [51] E.D.J. Smith, A.V. Zvyagin, D.D. Sampson, Real-time dispersion compensation in scanning interferometry, *Opt. Lett.* 27 (2002) 1998–2000.
- [52] L. Froehly, L. Furfaro, P. Sandoz, P. Jeanningros, Dispersion compensation properties of grating-based temporal-correlation optical coherence tomography systems, *Opt. Commun.* 282 (2009) 1488–1495.
- [53] L. Froehly, S. Iyer, F. Vanholsbeeck, Dual-fibre stretcher and coma as tools for independent 2nd and 3rd order tunable dispersion compensation in a fibre-based scan-free time domain optical coherence tomography system, *Opt. Commun.* 284 (1617) (2011) 4099–4106.

Please cite this article in press as: L. Froehly, J. Météau, Supercontinuum sources in optical coherence tomography: A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation, *Opt. Fiber Technol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yofte.2012.08.001>

## **Annexe 2 : Rapport synthétique d'activité**

### **concernant l'avenant « Doctorant conseil » réalisé dans l'entreprise RD-Biotech** **au contrat doctoral de JérémY Méteau pour l'année universitaire 2011-2012**

**Volume horaire globalement réalisé : 261**

#### **Détail des horaires effectivement réalisées :**

½ journée premier contact avec l'entreprise (visite et premières discussions sur le sujet)  
1 journée préparation du système de mesure  
1 journée explication sur la procédure à suivre pour la bonne utilisation des échantillons  
4 ½ journées pour la réalisation de mesure et analyse des résultats  
1 journée prise de connaissance de la cytométrie  
5 journées prises de photos dans différentes conditions  
1 journée réunions  
15 jours traitement d'images

#### **Détail des actions réellement menées :**

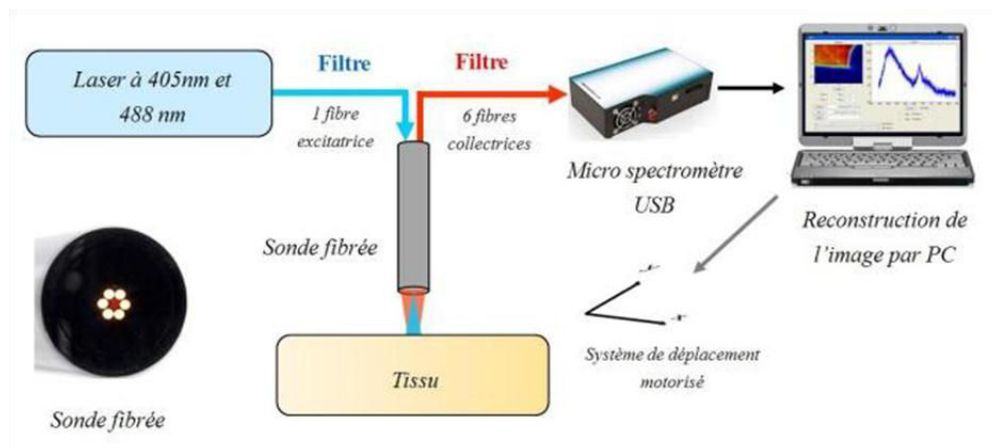
RD-Biotech est une société de biotechnologie qui propose des prestations sur mesure en biologie moléculaire, immunologie et ingénierie cellulaire dans le cadre de programmes Recherche et Développement et Précliniques (<http://www.rd-biotech.com/>).

Elle produit notamment des cellules embryonnaires appelées cellules MRC5 sensibles à certains virus. Quelques cellules (900 par cm<sup>2</sup>) sont disposées dans une boîte de culture. Celles-ci se divisent pour atteindre une concentration de 120000 cellules par cm<sup>2</sup> au bout de 3 semaines. Pendant ce laps de temps, les cellules ont vieilli et certaines sont différentes des autres de manière aléatoire et aujourd'hui imprévisibles.

L'objectif est de vérifier si le système de mesure de fluorescence développé au laboratoire permettrait dans un premier temps de différencier des cultures de haute et basse qualité et, dans un deuxième temps, d'étudier le vieillissement des cultures afin de prédire leur évolution future en termes de qualité..

Les premières rencontres ont permis au doctorant de visiter l'entreprise d'accueil et d'appréhender l'utilisation des boîtes de culture et de savoir comment les manipuler pour la réalisation de mesures sans détériorer les cultures cellulaires.

La première étape fut la réalisation de mesures préliminaires pour tenter d'obtenir des premiers résultats afin de décider de la suite des opérations. Pour cela et à deux reprises la société RD-Biotech a fourni un ensemble de boîtes de culture avec 3 cultures cellulaires de concentrations différentes. Ces boîtes de culture ont été amenées au laboratoire pour la réalisation des mesures de fluorescence (figure 1).



**Figure 89 : Schéma du système de mesure de fluorescence**

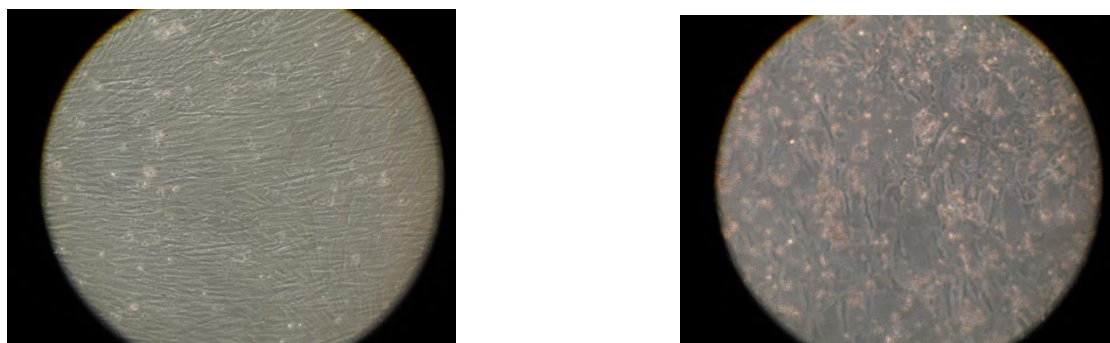
Le principe de mesure consiste à illuminer les cellules à une certaine longueur d'onde afin de les exciter et de récupérer l'émission de fluorescence induite à l'aide d'un spectromètre et d'un ordinateur. Le système est donc composé de deux sources lumineuses, deux lasers à 405 nm et à 488 nm. Ces faisceaux sont injectés dans une fibre appelée fibre excitatrice. La fluorescence est récupérée par 6 fibres collectrices reliées au spectromètre.

Pour les 3 concentrations et avec les deux sources lumineuses, aucun signal de fluorescence n'a été détecté. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela :

- Aucun fluorophore n'est présent dans les cellules.
- La couche cellulaire est trop fine (quelques  $\mu\text{m}$ ) pour le système de mesure.
- La concentration de fluorophore est trop faible.

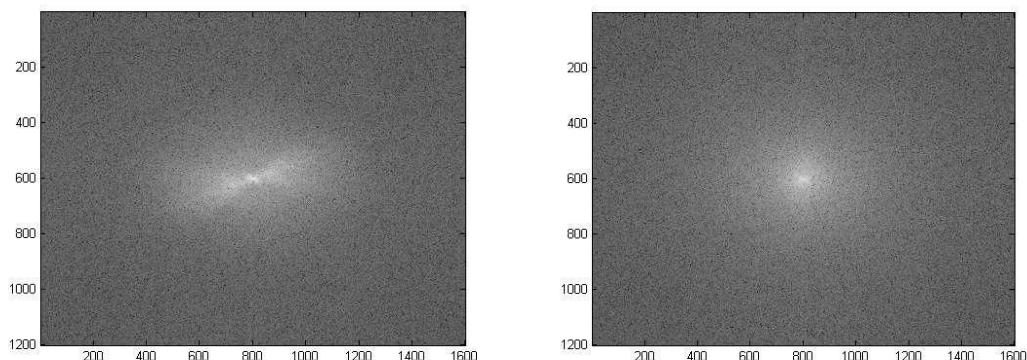
Aucune cible fluorescente présente dans les cellules n'ayant été identifiée, il a été décidé de renoncer à cette méthode au profit d'un traitement d'image.

En effet, entre des cultures cellulaires utilisables et non utilisables, la forme des cellules et leurs organisations sont différentes (voir figure 2).



**Figure 90 : Photos de culture cellulaire vue au microscope, à gauche : culture saine ; à droite : culture non utilisable**

Une centaine de photos ont été prises avec un appareil photo fixé sur un microscope. S'il est impossible de différencier les images en éclairage normal, des modifications sont visibles en contraste de phase. Plusieurs méthodes de traitement d'images ont été testées et certaines restent à tester. La figure 3 montre un résultat obtenu par transformée de Fourier sur les images ci-dessus.



**Figure 3 : Exemple de transformées de Fourier: à gauche : culture saine (TF à distribution bow-tie) ; à droite : culture non utilisable (TF à distribution circulaire).**

Ces résultats démontrent clairement la possibilité, dans un premier temps, de différencier numériquement des cultures de qualités différentes. D'autres techniques de traitement d'image doivent permettre de rendre compte d'autres paramètres relatifs à la morphologie des cultures comme le caractère plus ou moins courbé de l'alignement des cellules (figure 2 gauche) ou encore la présence de zones qu'on peut qualifier d'"anarchiques" (figure 2 droite).

La conclusion à tirer de ces études est que les techniques de traitement d'image doivent permettre l'estimation de la qualité des cultures au moyen de critères objectifs. Le fait que ces méthodes numériques peuvent être mise en œuvre au moyen d'un simple appareil photo numérique relié à un ordinateur portable contenant les codes de traitement d'image en font des candidates de premier choix quant à la problématique visée.

Plusieurs types de traitement d'images sont nécessaires afin de rendre compte des différentes structures morphologiques présentes dans les cultures. Cependant, leur mise en œuvre, la mise en évidence de marqueurs spécifiques (composites des méthodes de traitement d'image) et leur implémentation en un outil facile d'utilisation nécessite un volume horaire de travail largement au-delà du volume réservé au dispositif "doctorant conseil". Une suite de ces travaux, sous forme de bourse CIFRE par exemple, permettra la mise au point d'un outil performant, bon marché et simple d'utilisation.

## Bibliographie

- [1] S. K. Majumder, A. Uppa, and P. K. Gupta, "Nitrogen Laser Excited Autofluorescence Spectroscopy for Discrimination of Human Breast Malignancy," *Biomed. Opt. Spectrosc. Diagnostics*, vol. 3, pp. 142–146, 1996.
- [2] E. Péry, "Spectroscopie bimodale en diffusion élastique et autofluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation de tissus biologiques ex vivo et in vivo pour la détection de cancer," Thèse de l'université de Nancy, 2007.
- [3] M. B. Wallace, L. T. Perelman, V. Backman, J. M. Crawford, M. Fitzmaurice, M. Seiler, K. Badizadegan, S. J. Shields, I. Itzkan, R. R. Dasari, J. Van Dam, and M. S. Feld, "Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy," *Gastroenterology*, vol. 119, no. 3, pp. 677–682, Sep. 2000.
- [4] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006.
- [5] C. Bordier, "Diffusion de la lumière par des tissus biologiques : Etude expérimentale et modélisation par l'équation de transfert radiatif vectorielle.," Thèse de l'université Paris 6, 2007.
- [6] W. Drexler and J. G. Fujimoto, *Optical Coherence Tomography*. 2008.
- [7] P.-Y. Turpin, *Spectroscopies Vibrationnelles*. Master 2 LMMB, 2010.
- [8] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2006.
- [9] W. C. Lin, S. a Toms, M. Johnson, E. D. Jansen, and a Mahadevan-Jansen, "In vivo brain tumor demarcation using optical spectroscopy.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 73, no. 4, pp. 396–402, Apr. 2001.
- [10] I. Georgakoudi, E. E. Sheets, M. G. Müller, V. Backman, C. P. Crum, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Trimodal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers in vivo," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 186, no. 3, pp. 374–382, Mar. 2002.
- [11] V. Backman, M. B. Wallace, L. T. Perelman, J. T. Arendt, R. Gurjar, M. G. Müller, Q. Zhang, G. Zonios, E. Kline, J. a McGilligan, S. Shapshay, T. Valdez, K. Badizadegan, J. M. Crawford, M. Fitzmaurice, S. Kabani, H. S. Levin, M. Seiler, R. R. Dasari, I. Itzkan, J. Van Dam, M. S. Feld, and T. McGillican, "Detection of preinvasive cancer cells," *Nature*, vol. 406, no. 6791, pp. 35–6, Jul. 2000.
- [12] M. C. Skala, G. M. Palmer, C. Zhu, Q. Liu, M. Vrotsos, C. L. Marshak-stone, and A. Gendron-fitzpatrick, "An investigation of fiber-optic probe designs for optical spectroscopic diagnosis of epithelial pre-cancers," *Lasers Surg. Med.*, vol. 34, no. 1, pp. 25–38, 2004.

- [13] Y. Hernandez Mier, "Construction rapide d'images panoramiques applicables à l'exploration cystoscopique et à l'endoscopie de fluorescence en cancérologie," Thèse de l'Université de Nancy, 2007.
- [14] G. A. Wagnieres, W. M. Star, and B. C. Wilson, "In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications," *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, no. 5, pp. 603–632, 1998.
- [15] G. Bourg-Heckly, *Interaction Lumière Tissu*. Master 2 LMMB, 2010.
- [16] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca, "Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis.," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 47, pp. 555–606, Jan. 1996.
- [17] R. R. Anderson and J. A. Parrish, "The Optics of Human Skin," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 77, no. 1, pp. 13–19, 1981.
- [18] S. Valette, "La Spectroscopie tissulaire appliquée à la détection des états précancéreux et cancéreux précoces," in *Applications de l'optoélectronique*, Hermes Sci., pp. 103–168, 2002.
- [19] A. Policard, "Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood," *C. R. Soc. Biol.*, vol. 91, pp. 1423–1428, 1924.
- [20] G. E. Moore, W. T. Peyton, L. A. French, and W. W. Walker, "The clinical use of fluorescein in neurosurgery," *J. Neurosurg.*, vol. 5, pp. 392–398, 1948.
- [21] R. C. Mellors, A. Glassman, and G. N. Papanicolaou, "A microfluorometric scanning method for the detection of cancer cells in smears of exfoliated cells," *Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 458–468, 1952.
- [22] D. S. Rassmussen-Taxdal, G. E. Ward, and F. H. Figge, "Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin.," *Cancer*, vol. 8, no. 1, pp. 78–81.
- [23] R. L. Lipson, E. J. Baldes, and A. M. Olsen, "Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease," *Dis. Chest*, vol. 46, no. 6, 1964.
- [24] R. L. Lipson, J. H. Pratt, E. J. Baldes, and M. B. Dockerty, "Hematoporphyrin Derivative for Detection of Cervical Cancer," *Obstet. Gynecol.*, vol. 24, no. 1, pp. 78–84, 1964.
- [25] H. B. Gregorie, E. Horger, D. Mi, J. L. Ward, J. F. Green, T. Richards, and H. C. Robertson, "Hematoporphyrin-Derivative Fluorescence in Malignant Neoplasms precipitate Nwas washed thoroughly Nwith," *Ann. Surg.*, pp. 820–828, 1967.
- [26] R. R. Alfano, A. Pradhan, G. C. Tang, and S. J. Wahl, "Optical spectroscopic diagnosis of cancer and normal breast tissues," *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 6, no. 5, p. 1015, May 1989.

- [27] W. Lohmann and E. Paul, "In situ detection of melanomas by fluorescence measurements.," *Naturwissenschaften*, vol. 75, no. 4, pp. 201–2, Apr. 1988.
- [28] YL. Yang, YM. Ye, FM. Li, YF. Li, and PZ. Ma, "Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin," *Lasers Surg. Med.*, vol. 7, no. 6, pp. 528–532, 1987.
- [29] M. Kriegmair, H. G. Stepp, P. Steinbach, W. Lumper, A. Ehsan, K. Rick, R. Knüchel, R. Baumgartner, and A. Hofstetter, "Fluorescence Cystoscopy following Intravesical Instillation of 5-Aminolevulinic Acid : A new procedure with High sensitivity for detection of Hardly visible urothelial neoplasias," *Urol. Int.*, vol. 55, no. 4, pp. 190–196, 1995.
- [30] S. Bonneau, "Imagerie de fluorescence," 2013. [Online]. Available: [http://stephanie.bonneau.free.fr/cour\\_ima\\_fluo.pdf](http://stephanie.bonneau.free.fr/cour_ima_fluo.pdf).
- [31] N. Ramanujam, "Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues.," *Neoplasia*, vol. 2, no. 1–2, pp. 89–117, 2000.
- [32] N. van der Veen, H. L. van Leengoed, and W. M. Star, "In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin: increased damage after multiple irradiations.," *Br. J. Cancer*, vol. 70, no. 5, pp. 867–72, Nov. 1994.
- [33] D. J. Robinson, H. S. De Bruijn, N. Van Der Veen, M. R. Stringer, S. B. Brown, and W. M. Star, "Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching during ALA-mediated photodynamic therapy of UVB-induced tumors in hairless mouse skin," *Photochem. Photobiol.*, vol. 69, no. 1, pp. 61–70, 1999.
- [34] N. Lange, P. Jichlinski, M. Zellweger, M. Forrer, a Marti, L. Guillou, P. Kucera, G. Wagnières, and H. van den Bergh, "Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study.," *Br. J. Cancer*, vol. 80, no. 1–2, pp. 185–93, Apr. 1999.
- [35] D. R. Braichotte, G. a Wagnières, R. Bays, P. Monnier, and H. E. van den Bergh, "Clinical pharmacokinetic studies of photofrin by fluorescence spectroscopy in the oral cavity, the esophagus, and the bronchi.," *Cancer*, vol. 75, no. 11, pp. 2768–78, Jun. 1995.
- [36] L. Cincotta, J. W. Foley, T. MacEachern, E. Lampros, and a H. Cincotta, "Novel photodynamic effects of a benzophenothiazine on two different murine sarcomas.," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 5, pp. 1249–58, Mar. 1994.
- [37] H. Nilsson, J. Johansson, K. Svanberg, S. Svanberg, G. Jori, E. Reddi, a Segalla, D. Gust, a L. Moore, and T. a Moore, "Laser-induced fluorescence in malignant and normal tissue in mice injected with two different carotenoporphyrins.," *Br. J. Cancer*, vol. 70, no. 5, pp. 873–9, Nov. 1994.
- [38] E. Reddi, a Segalla, G. Jori, P. K. Kerrigan, P. a Liddell, a L. Moore, T. a Moore, and D. Gust, "Carotenoporphyrins as selective photodiagnostic agents for tumours.," *Br. J. Cancer*, vol. 69, no. 1, pp. 40–5, Jan. 1994.

- [39] O. V. Braginskaja, V. V. Lazarev, V. I. Polsachev, L. B. Rubin, and V. E. Stoskii, "Fluorescent diagnostics of human gastric cancer and sodium fluorescein accumulation in experimental gastric cancer in rats," *Cancer Lett.*, vol. 69, no. 2, pp. 117–121, 1993.
- [40] S. J. Hart and R. D. JiJi, "Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy," *Analyst*, vol. 127, no. 12, pp. 1693–1699, Dec. 2002.
- [41] U. Utzinger and R. R. Richards-Kortum, "Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 8, no. 1, pp. 121–47, Jan. 2003.
- [42] T. Papaioannou, N. W. Preyer, Jr., Q. Fang, H. Kurt, M. Carnohan, R. Ross, A. Brightwell, G. Cottone, L. R. Jones, and L. Marcu, "Performance evaluation of fiber optic probes for tissue lifetime fluorescence spectroscopy," *SPIE*, vol. 4958, pp. 43–50, Jul. 2003.
- [43] C. Zhu, Q. Liu, and N. Ramanujam, "Effect of fiber optic probe geometry on depth-resolved fluorescence measurements from epithelial tissues: a Monte Carlo simulation," *J. Biomed. Opt.*, vol. 8, no. 2, pp. 237–47, Apr. 2003.
- [44] V. Tuchin, *Tissue Optics : Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. SPIE, p. 840, 2007.
- [45] T. J. Pfefer, K. T. Schomacker, M. N. Ediger, and N. S. Nishioka, "Multiple-fiber probe design for fluorescence spectroscopy in tissue," *Appl. Opt.*, vol. 41, no. 22, pp. 4712–21, Aug. 2002.
- [46] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*. Roberts & Company Publishers, 1996.
- [47] C. S. French and V. K. Young, "The Fluorescence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll," *J. Gen. Physiol.*, pp. 873–890, 1951.
- [48] A. A. Gitelson, C. Buschmann, and H. K. Lichtenthaler, "The Chlorophyll Fluorescence Ratio F735/F700 as an Accurate Measure of the Chlorophyll Content in Plants," *Remote Sens. Environ.*, vol. 4257, no. 69, pp. 296–302, 1999.
- [49] Z. G. Cerovic, G. Samson, F. Morales, N. Tremblay, and I. Moya, "Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring : present state and prospects," *Agronomie*, vol. 19, pp. 543–578, 1999.
- [50] G. Latouche, "Fluorescence bleu-verte variable des végétaux : Variations photo-induites de la fluorescence du NADPH chloroplastique," Thèse de l'université Paris 6, 2000.
- [51] O. A. Inc, "The fluorescence Microscope," 2012. [Online]. Available: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/anatomyhome.html>.
- [52] I. Georgakoudi, B. C. Jacobson, M. G. Müller, E. P. Changes, M. G. Mu, E. E. Sheets, K. Badizadegan, D. L. Carr-locke, C. P. Crum, C. W. Boone, R. R. Dasari, J. Van



- Dam, and M. S. Feld, "NAD(P)H and Collagen as in Vivo Quantitative Fluorescent Biomarkers of Epithelial Precancerous Changes," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 3, pp. 682–687, 2002.
- [53] M. Jette and S. Thibeault, "Morphology of Vocal Fold Mucosa : Histology to Genomics," in *Understanding Voice Problems : A Physiological Perspective for Diagnosis and Treatment*, R. Colton, J. K. Casper, and R. Leonard, Eds. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 64–75, 2010.
- [54] A. F. Fercher, W. Drexler, C. K. Hitzenberger, and T. Lasser, "Optical coherence tomography — principles and applications," *Reports Prog. Phys.*, vol. 66, pp. 239–303, 2003.
- [55] H. Liang, M. G. Cid, R. G. Cucu, G. M. Dobre, and A. G. Podoleanu, "En-face optical coherence tomography – a novel application of non-invasive imaging to art conservation," *Opt. Express*, vol. 13, no. 16, pp. 69–74, 2005.
- [56] T. L. Szabo, *Diagnostic ultrasound imaging : inside out*. Academic Press, 2004.
- [57] "Les Ultrasons en médecine," 2013. [Online]. Available: <http://spiral.univ-lyon1.fr/17-SWF/page.asp?id=2836>.
- [58] L. Froehly and R. Leitgeb, "Scan-free optical correlation techniques: history and applications to optical coherence tomography," *J. Opt.*, vol. 12, no. 8, p. 084001, Aug. 2010.
- [59] J. F. De Boer, B. Cense, B. H. Park, M. C. Pierce, G. J. Tearney, and B. E. Bouma, "Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, vol. 28, no. 21, pp. 2067–2069, 2003.
- [60] M. A. Duguay and A. T. Mattick, "Ultrahigh Speed Photography of Picosecond Light Pulses and Echoes," *Appl. Opt.*, vol. 10, no. 9, pp. 2162–2170, 1971.
- [61] F. L. Pedrotti and L. S. Pedrotti, *Introduction to optics*. Prentice-Hall International, 1993.
- [62] A. P. Bruckner, "Picosecond light scattering measurements of cataract microstructure," *Appl. Opt.*, no. August 1977, pp. 3177–3183, 1978.
- [63] J. G. Fujimoto, C.A. Puliafito, R. Margolis, A. Oseroff, S. De Silvestri, and E. P. Ippen, "Femtosecond optical ranging in biological systems," *Opt. Lett.*, vol. 11, no. 3, pp. 150–152, 1986.
- [64] P. A. Flournoy, R. W. McClure, and G. Wyntjes, "White-Light Interferometric Thickness Gauge," *Appl. Opt.*, vol. 11, no. 9, pp. 1907–1915, 1972.
- [65] R. C. Youngquist, S. Carr, and D. E. N. Davies, "Optical coherence-domain reflectometry: a new optical evaluation technique," *Opt. Lett.*, vol. 12, no. 3, p. 158, Mar. 1987.

- [66] K. Takada, I. Yokohama, K. Chida, and J. Noda, "New measurement system for fault location in optical waveguide devices based on an interferometric technique.," *Appl. Opt.*, vol. 26, no. 9, pp. 1603–6, May 1987.
- [67] A. F. Fercher, K. Mengedoht, and W. Werner, "Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light," *Opt. Lett.*, vol. 13, no. 3, p. 186, Mar. 1988.
- [68] C. K. Hitzenberger and U. Wien, "Optical Measurement of the Axial Eye Length by Laser Doppler Interferometry," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 32, no. 3, pp. 616–624, 1991.
- [69] X. Clivaz, R. P. Novak, and H. H. Gilgen, "High-resolution reflectometry in biological tissues," *Opt. Lett.*, vol. 17, no. 1, pp. 6–9, 1992.
- [70] D. Huang, E. A. Swansson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, "Optical Coherence Tomography," *Science (80-. )*, vol. 254, pp. 1178–1181, 1991.
- [71] E. A. Swanson, J.A. Izatt, M.R. Hee, D. Huang, C.P. Lin, J.S. Schuman, C.A. Puliafito, J.G. Fujimoto, "In vivo retinal imaging by optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, vol. 18, no. 21, pp. 18–21, 1993.
- [72] M. R. Hee, C. a Puliafito, J. S. Duker, E. Reichel, J. G. Coker, J. R. Wilkins, J. S. Schuman, E. a Swanson, and J. G. Fujimoto, "Topography of diabetic macular edema with optical coherence tomography.," *Ophthalmology*, vol. 105, no. 2, pp. 360–70, Feb. 1998.
- [73] J. Ballif, R. Gianotti, P. Chavanne, R. Walti, and R. . Salathé, "Rapid and scalable scans at 21 m/s in optical low-coherence reflectometry," *Opt. Lett.*, vol. 22, no. 11, pp. 757–759, 1997.
- [74] G. J. Tearney, B. E. Bouma, and J. G. Fujimoto, "High-speed phase- and group-delay scanning with a grating-based phase control delay line.," *Opt. Lett.*, vol. 22, no. 23, pp. 1811–3, Dec. 1997.
- [75] G. J. Tearney, M. E. Brezinski, B. E. Bouma, S. A. Boppart, C. Pitris, J. F. Southern, and J. G. Fujimoto, "In Vivo Endoscopic Optical Biopsy with Optical Coherence Tomography," *Science*, vol. 276, no. 5321, pp. 2037–2039, Jun. 1997.
- [76] I. Hartl, X. D. Li, C. Chudoba, R. K. Ghanta, T. H. Ko, and J. G. Fujimoto, "Ultrahigh-resolution optical coherence tomography using continuum generation in an air – silica microstructure optical fiber," *Opt. Lett.*, vol. 26, no. 9, pp. 608–610, 2001.
- [77] W. Drexler, U. Morgner, F. X. Kärtner, C. Pitris, S. a Boppart, X. D. Li, E. P. Ippen, and J. G. Fujimoto, "In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography.," *Opt. Lett.*, vol. 24, no. 17, pp. 1221–3, Sep. 1999.

- [78] F. Fercher, K. Hitzenberger, G. Kamp, and S. . El-Zaiat, "Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry," *Opt. Commun.*, vol. 117, no. May, pp. 43–48, 1995.
- [79] C. Froehly, A. Lacourt, and J. C. Vienot, "Notion de réponse impulsionnelle et de fonction de transfert temporelles des pupilles optiques, justifications expérimentales et applications," *Nouv. Rev. d'Optique*, vol. 4, no. 4, 1973.
- [80] M. Wojtkowski and A. Kowalczyk, "Full range complex spectral optical coherence tomography technique in eye imaging," *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 16, pp. 1415–1417, 2002.
- [81] M. A. Choma, M. V Sarunic, C. Yang, and J. A. Izatt, "Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography," *Opt. Express*, vol. 11, no. 18, 2003.
- [82] R. Leitgeb, C. Hitzenberger, and A. Fercher, "Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography.," *Opt. Express*, vol. 11, no. 8, pp. 889–94, Apr. 2003.
- [83] M. Wojtkowski, V. J. Srinivasan, T. H. Ko, J. G. Fujimoto, A. Kowalczyk, and J. S. Duker, "Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation," *Opt. Express*, vol. 12, no. 11, pp. 707–709, 2004.
- [84] S. R. Chinn, E. a Swanson, and J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source.," *Opt. Lett.*, vol. 22, no. 5, pp. 340–2, Mar. 1997.
- [85] B. Golubovic, B. E. Bouma, G. J. Tearney, and J. G. Fujimoto, "Optical frequency-domain reflectometry using rapid wavelength tuning of a Cr<sup>4+</sup>:forsterite laser.," *Opt. Lett.*, vol. 22, no. 22, pp. 1704–6, Nov. 1997.
- [86] W. Wieser, B. R. Biedermann, T. Klein, C. M. Eigenwillig, and R. Huber, "Multi-megahertz OCT: High quality 3D imaging at 20 million A-scans and 4.5 GVoxels per second.," *Opt. Express*, vol. 18, no. 14, pp. 14685–704, Jul. 2010.
- [87] I. Verrier, C. Veillas, T. Lépine, F. Nguyen, G. Thuret, and P. Gain, "Interfaces detection after corneal refractive surgery by low coherence optical interferometry," *Biomed. Opt. Express*, vol. 1, no. 5, pp. 290–294, 2010.
- [88] M. Ouadour-Abbar, "Principe de tomographie et spectro- tomographie optique de coherence par intercorrelation sans balayage basee sur un reseau de diffraction," Thèse de l'Université de Franche-Comté, 2009.
- [89] L. Froehly, *Tomographie Optique Cohérente : Principes*. Master 2 PICS, 2012.
- [90] P. Connes, "Un nouveau type de spectromètre : l'interféromètre à réseaux," *Opt. Acta*, vol. 4, no. 4, 1957.

- [91] G. Brun, I. Verrier, M. Ramos, J. P. Goure, P. Ottavi, and A. M. Lambert, "Measurement of mode times of flight in multimode fibers by an interferometric method using polychromatic light: theoretical approach and experimental results.," *Appl. Opt.*, vol. 35, no. 7, pp. 1129–34, Mar. 1996.
- [92] I. Zeylikovich and R. R. Alfano, "Ultrafast dark-field interferometric microscopic reflectometry," *Opt. Lett.*, vol. 21, no. 20, pp. 1682–1684, 1996.
- [93] I. Zeylikovich and R. R. Alfano, "Ultrafast correlation interferometric imaging through a moving scattering medium," *Opt. Commun.*, vol. 135, no. 1, pp. 217–222, 1997.
- [94] I. Zeylikovich, A. Gilerson, and R. R. Alfano, "Nonmechanical grating-generated scanning coherence microscopy," *Opt. Lett.*, vol. 23, no. 23, pp. 1797–1799, 1998.
- [95] Y. Watanabe, K. Yamada, and M. Sato, "In vivo non-mechanical scanning grating-generated optical coherence tomography using an InGaAs digital camera," *Opt. Commun.*, vol. 261, no. 2, pp. 376–380, May 2006.
- [96] P. Koch, V. Hellemanns, and G. Hüttmann, "Linear optical coherence tomography system with extended measurement range," *Opt. Lett.*, vol. 31, no. 19, pp. 2882–2884, 2006.
- [97] Y. Watanabe, F. Sajima, T. Itagaki, K. Watanabe, and Y. Shuto, "High-speed linear detection time domain optical coherence tomography with reflective grating-generated spatial reference delay," *Applied optics*, vol. 48, no. 18, pp. 3401–3406, 2009.
- [98] L. Froehly, M. Ouadour, L. Furfaro, P. Sandoz, and T. Gharbi, "Optical coherence Spectro-Tomography by all-Optical Depth-Wavelength analysis," *Arxiv Prepr. physics/0611198*, pp. 9–11, 2006.
- [99] L. Froehly, L. Furfaro, P. Sandoz, and P. Jeanningros, "Dispersion compensation properties of grating-based temporal-correlation Optical Coherence Tomography systems," *Opt. Commun.*, vol. 282, no. 7, pp. 1488–1495, Apr. 2009.
- [100] L. Froehly, S. Iyer, and F. Vanholsbeeck, "Dual-fibre stretcher and coma as tools for independent 2nd and 3rd order tunable dispersion compensation in a fibre-based 'scan-free' time domain optical coherence tomography system," *Opt. Commun.*, vol. 284, no. 16–17, pp. 4099–4106, Aug. 2011.
- [101] A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, M. Sticker, and E. Moreno-barriuso, "A thermal light source technique for optical coherence tomography," *Opt. Commun.*, vol. 185, no. November, pp. 57–64, 2000.
- [102] L. Vabre, a Dubois, and a C. Boccara, "Thermal-light full-field optical coherence tomography.," *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 7, pp. 530–2, Apr. 2002.
- [103] SCHOTT, "Optical Glass Data sheets," 2014. [Online]. Available: [http://www.schott.com/advanced\\_optics/us/abbe\\_datasheets/schott\\_datasheet\\_all\\_us.pdf](http://www.schott.com/advanced_optics/us/abbe_datasheets/schott_datasheet_all_us.pdf).

- [104] B. Povazay, K. Bizheva, a Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, a F. Fercher, W. Drexler, a Apolonski, W. J. Wadsworth, J. C. Knight, P. S. J. Russell, M. Vetterlein, and E. Scherzer, "Submicrometer axial resolution optical coherence tomography.," *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 20, pp. 1800–2, Jan. 2002.
- [105] E. D. J. Smith, A. V Zvyagin, and D. D. Sampson, "Real-time dispersion compensation in scanning interferometry.," *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 22, pp. 1998–2000, Nov. 2002.
- [106] L. Froehly and J. Météau, "Supercontinuum sources in optical coherence tomography : A state of the art and the application to scan-free time domain correlation techniques and depth dependant dispersion compensation," *Opt. Fiber Technol.*, vol. 18, no. March 2012, pp. 1–22, Sep. 2012.

The logo for the École doctorale SPIM. It features a solid yellow horizontal bar on the left, followed by the letters 'SPIM' in a white, sans-serif font.

■ École doctorale SPIM 16 route de Gray F - 25030 Besançon cedex

■ tél. +33 (0)3 81 66 66 02 ■ [ed-spim@univ-fcomte.fr](mailto:ed-spim@univ-fcomte.fr) ■ [www.ed-spim.univ-fcomte.fr](http://www.ed-spim.univ-fcomte.fr)

The logo of the University of Franche-Comté. It consists of a stylized 'U' and 'FC' in black, with a small yellow vertical bar between them. Below this, the words 'UNIVERSITÉ' and 'DE FRANCHE-COMTÉ' are written in a smaller, black, sans-serif font.

**UFC**  
UNIVERSITÉ  
DE FRANCHE-COMTÉ